

Mechanismen der Entstehung genetischer Variabilität bei *Helicobacter pylori*

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz

Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Stefan Kulick

geboren am 24. Januar 1978 in Buchholz i.d.N.

2009

Referent: Prof. Dr. Sebastian Suerbaum

Korreferent: Prof. Dr. Gerald-F. Gerlach

Tag der Promotion: 27. Mai 2009

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Medizinischen Hochschule Hannover (November 2004 - November 2008) unter der Leitung von Prof. Dr. Sebastian Suerbaum angefertigt.

Kurzzusammenfassung

Eine charakteristische Besonderheit von *Helicobacter pylori* ist seine außerordentlich hohe genetische Variabilität. Diese hohe Plastizität des Genoms wird durch eine erhöhte Mutationsrate ($\sim 10^{-6}$) sowie eine hohe Rekombinationsfrequenz hervorgerufen. Viele der in *E. coli* beschriebenen Gene der DNA-Reparatur- und Rekombinationssysteme sind bisher in *H. pylori* nicht beschrieben worden (z.B. *mutHLS*) und zur Funktion der identifizierten Gene gibt es nur wenige systematische Untersuchungen. Innerhalb dieser Arbeit wurden die Funktionen der Gene *comB10*, *mutY*, *nth*, *ung*, *xth*, *recA*, *recB*, *recG*, *recN*, *recR*, *recJ* und *xseA* in der DNA-Reparatur und bei der Rekombination untersucht.

In *E. coli* ist die Glykosylase MutY Teil des Basen-Exzisions-Systems. Die Inaktivierung des *mutY*-Gens in *H. pylori* führte zu einer signifikanten Erhöhung der Rifampicin-Resistenz (Rif) vermittelnden Mutationen im *rpoB*-Gen um einen Faktor von 14 bis 25. Sequenzanalysen Rif-resistenter Klone zeigten, dass der Verlust der MutY-Glykosylase eine starke Auswirkung auf die Verteilung der C-zu-A-Transversionen im *rpoB*-Gen hatte. Die Ergebnisse der Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die Effizienz, mit der MutY vor Mutationen schützt, vom Sequenzkontext der Mutation abhängig ist. Weiterhin konnte mit Hilfe einer kompetitiven Kultur gezeigt werden, dass die Inaktivierung des *mutY*-Gens mit einer Verminderung der bakteriellen Fitness in der stationären Phase verbunden war.

Der genetische Austausch in *H. pylori* wurde mit Hilfe eines *in vitro*-Transformationssystems untersucht, in dem ein *H. pylori*-Rezipient mit genomischer DNA eines Rif-resistenten *H. pylori*-Donors inkubiert wurde. Durch die Inkubation mit DNA erhöhte sich die Anzahl Rif-resistenter Klone im Vergleich zur Mutationsfrequenz um das 22- bis 199-fache. Die mittlere Länge der Importe variierte zwischen 1294 Bp und 3853 Bp und war von der Rezipient/Donor-Kombination abhängig. In etwa 10% der untersuchten Sequenzen waren die importierten DNA-Fragmente von Segmenten der Rezipienten-DNA mit einer mittleren Länge von 84 Bp unterbrochen (ISR). Zwölf Gene wurden inaktiviert, um ihre Rolle in der Determination der DNA-Importlänge sowie ihre Funktion in der Entstehung der ISR zu untersuchen. Die Inaktivierung der Glykosylase MutY führte zu längeren DNA-Importen, hatte aber keinen signifikanten Einfluss auf die ISR-Frequenz. Die Überexpression des *mutY*-Gens resultierte in einer signifikanten Erhöhung der ISR-Frequenz. Somit scheint MutY eine wichtige Komponente in der Entstehung von ISR zu sein. ISR tragen wahrscheinlich zu der hohen allelischen Diversität von *H. pylori* und dem charakteristisch niedrigen Kopplungsungleichgewicht des Bakteriums bei.

Schlagwörter: Helicobacter pylori, Rekombination, DNA-Reparatur, DNA-Importe

Abstract

One of the most striking characteristics of *Helicobacter pylori* is its high genetic variability. This high genomic plasticity is due to an increased mutation rate ($\sim 10^{-6}$) and frequent recombination events during a mixed infection with multiple strains. Many of the genes involved in DNA repair and recombination pathways known in *E. coli* are lacking in *H. pylori* (e.g. *mutHLS*). Only few genes involved in DNA repair and recombination have been functionally characterized in *H. pylori*. In this study, the impact of the *H. pylori* genes *comB10*, *mutY*, *nth*, *ung*, *xth*, *recA*, *recB*, *recG*, *recN*, *recR*, *recJ*, and *xseA* on DNA repair and recombination was analyzed.

In *E. coli*, the DNA glycosylase MutY is a part of the base excision repair system. Inactivation of *mutY* in *H. pylori* resulted in an increase of the mutation frequency by a factor of 14 to 25. Sequence analysis of *rpoB* in Rifampicin (Rif) resistant clones selected from the *mutY* mutant showed that the inactivation of *mutY* had a profound impact on the distribution of C to A transversions within *rpoB*. This finding suggests that the efficiency with which *mutY* prevents transversions is strongly dependent upon the sequence context. Inactivation of *mutY* was associated with a stationary phase fitness deficit in competitive cultures with the wild type strain.

Using an *in vitro* transformation system, in which a recipient strain was co-incubated with genomic DNA derived from donor strains that harbored point mutations in *rpoB* conferring resistance to Rif, the frequencies of mutation and recombination of *H. pylori* wild type and mutant strains were determined. The addition of genomic DNA derived from a Rif resistant donor strain increased the number of resistant clones 22- to 199-fold. The mean length of incorporated DNA fragments varied between different recipient strains (1294 - 3853 bp). In about 10% of recombinant clones, the imported fragments of donor DNA were interrupted by short interspersed sequences of the recipient (ISR) with a mean length of 84 bp. Twelve candidate genes were inactivated in order to identify genes involved in the control of import length and generation of ISR. Inactivation of the antimutator glycosylase MutY increased the length of imports, but did not have a significant effect on ISR frequency. Overexpression of *mutY* strongly increased the frequency of ISR, indicating that MutY is part of at least one ISR-generating pathway. The formation of ISR in *H. pylori* increases allelic diversity, and contributes to the uniquely low linkage disequilibrium characteristic of this pathogen.

Keywords: *Helicobacter pylori*, recombination, DNA repair, DNA imports

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Das Humanpathogen Helicobacter pylori</i>	1
1.1.1 Historie des Erregers.....	1
1.1.2 Mikrobiologie und Klinik	2
1.2 <i>Virulenzfaktoren von H. pylori</i>	5
1.3 <i>Diversität und Populationsstruktur von H. pylori</i>	9
1.3.1 Genetische und genomische Variabilität.....	9
1.3.2 Populationsstruktur	11
1.4 <i>Natürliche Kompetenz, Rekombination und DNA Reparatur in H. pylori</i>	12
1.4.1 Das DNA-Aufnahmesystem ComB.....	12
1.4.2 Rekombination.....	13
1.4.3 DNA-Reparatursysteme.....	18
1.5 <i>Zielsetzung</i>	23
2 Material.....	26
2.1 <i>Geräte</i>	26
2.2 <i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</i>	26
2.3 <i>Bakterienstämme</i>	27
2.3.1 <i>Helicobacter pylori</i> -Stämme.....	27
2.3.2 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	28
2.4 <i>Plasmide</i>	28
2.5 <i>Oligonukleotid-Primer</i>	30

3	Methoden	33
3.1	<i>Kultivierung und Lagerung von Bakterien</i>	<i>33</i>
3.1.1	Anzucht und Kultivierung von <i>H. pylori</i>	33
3.1.2	Anzucht und Kultivierung von <i>E. coli</i>	34
3.1.3	Lagerung von Bakterien.....	34
3.2	<i>DNA-Arbeitstechniken</i>	<i>35</i>
3.2.1	Isolierung von DNA aus Bakterien.....	35
3.2.2	Quantifizierung und Qualitätskontrolle von DNA.....	36
3.2.3	Standard-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.2.4	PCR-Synthese fehlerarmer Produkte	37
3.2.5	Spezifische PCR zum Auffinden bestimmter Spontanmutationen im <i>rpoB</i> -Gen	37
3.2.6	Analyse und Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	38
3.2.7	Sequenzierung von DNA	39
3.3	<i>RNA-Arbeitstechniken.....</i>	<i>40</i>
3.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>H. pylori</i>	41
3.3.2	Reverse Transkription von RNA.....	42
3.3.3	Semiquantitative Amplifikation von cDNA	42
3.3.4	Quantitative Amplifikation von cDNA mittels „Real-Time“-PCR.....	43
3.4	<i>Inaktivierung von Genen in H. pylori</i>	<i>44</i>
3.4.1	Klonierung eines <i>H. pylori</i> -Gens	45
3.4.2	Transformation kompetent gemachter <i>E. coli</i> -Zellen	46
3.4.3	Inverse PCR zur Einbringung von Restriktionsschnittstellen.....	47
3.4.4	Unterbrechung des Gens durch eine Antibiotika-Resistenzkassette.....	47
3.4.5	Natürliche Transformation von <i>H. pylori</i>	49
3.5	<i>Untersuchung von H. pylori im in vitro-Transformationssystem.....</i>	<i>50</i>
3.6	<i>Elektroporation von H. pylori.....</i>	<i>51</i>
3.7	<i>Sequenzierung des rpoB-Gens</i>	<i>52</i>
3.8	<i>Analyse der Mutationsfrequenzen in H. pylori</i>	<i>52</i>
3.9	<i>Analyse der Rifampicin-Resistenz vermittelnden Mutationen im rpoB-Gen</i>	<i>53</i>

3.9.1	Positionen der Mutationen im <i>rpoB</i> -Gen.....	53
3.9.2	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für ausgesuchte Spontanmutationen	54
3.10	Wachstumskurven und kompetitive Ko-Kultivierung von <i>H. pylori</i>	54
3.11	Statistik.....	55
3.12	Bioinformatik	57
4	Ergebnisse.....	59
4.1	Untersuchung der Spontanmutationsrate von <i>H. pylori</i>	59
4.1.1	Frequenz Rifampicin-Resistenz verleihender Spontanmutationen im <i>rpoB</i> -Gen in <i>H. pylori</i> -Wildtyp-Stämmen	59
4.1.2	Untersuchung des Einflusses einer Inaktivierung des <i>mutY</i> -Gens auf die Mutationsfrequenz	60
4.1.3	Analyse der Verteilung und Art Rif-Resistenz verleihender Punktmutationen in <i>H. pylori</i> -Wildtyp-Stämmen und <i>mutY</i> -Mutanten	63
4.1.4	Auswirkung der dominierenden Rif-Resistenz vermittelnden Mutationen von Wildtyp-Stamm und <i>mutY</i> -Mutante auf das Wachstum und die Resistenz gegen Rifampicin	67
4.1.5	Auswirkung der Inaktivierung von <i>mutY</i> auf die Fitness von <i>H. pylori</i>	69
4.1.6	Untersuchung von klinischen <i>H. pylori</i> -Isolaten mit natürlich inaktivierten <i>mutY</i> -Genen	70
4.2	Untersuchung der Rekombination von <i>H. pylori</i> -Wildtyp-Stämmen <i>in vitro</i>	72
4.2.1	Rekombinationshäufigkeiten verschiedener Kombinationen von Rezipienten- Stamm und Donor-DNA	72
4.2.2	Analyse der Länge der DNA-Importe verschiedener Rezipienten/Donor- Kombinationen.....	75
4.2.3	Untersuchung der Mosaikstruktur von DNA-Importen.....	78
4.2.4	Transformation des Wildtyp-Stammes 26695 mit J99-R3 PCR-Produkt	79
4.3	Untersuchung des Einflusses des DNA-Aufnahmesystems auf die Mutationsfrequenz und Rekombination von <i>H. pylori in vitro</i>	81
4.3.1	Frequenzen Rif-resistenter Klone mit und ohne Zugabe von Donor-DNA	81

4.3.2	Umgehung des DNA-Aufnahmesystems durch die Einbringung von Donor-DNA mittels Elektroporation	82
4.4	<i>Untersuchung der Auswirkung von Gen-Inaktivierungen der DNA-Reparatur- und Rekombinationsmechanismen von H. pylori im in vitro-Transformationssystem.....</i>	<i>83</i>
4.4.1	Untersuchung der Rekombinase RecA	84
4.4.2	Untersuchung des RecB-Homologs HP1553	84
4.4.3	Untersuchung der Helikase RecG	85
4.4.4	Untersuchung der Exonukleasen RecJ und ExoVII	86
4.4.5	Untersuchung der Gene <i>recN</i> und <i>recR</i>	87
4.4.6	Untersuchung der Glykosylasen Ung und Nth sowie der Endonuklease Xth ..	88
4.4.7	Analyse der Rekombination in <i>mutY</i> -Mutanten	91
5	Diskussion	96
5.1	<i>Mutationsfrequenzen von H. pylori-Wildtyp-Stämmen</i>	<i>97</i>
5.2	<i>MutY wirkt als starker Antimutator in H. pylori</i>	<i>98</i>
5.3	<i>MutY schützt eine bestimmte Position im rpoB-Gen effektiver vor Transversionen als andere</i>	<i>99</i>
5.4	<i>Ein Verlust von MutY führt zu einem Fitnessdefizit in H. pylori</i>	<i>100</i>
5.5	<i>Phasenvariabilität von mutY und die Auswirkung auf die Mutationsrate</i>	<i>101</i>
5.6	<i>Rekombinationsfrequenzen von H. pylori-Wildtyp-Stämmen</i>	<i>102</i>
5.7	<i>Länge der DNA-Importe in H. pylori-Wildtyp-Stämmen</i>	<i>103</i>
5.8	<i>Importierte DNA-Fragmente sind durchsetzt mit Segmenten der Rezipienten-Sequenz</i>	<i>107</i>
5.9	<i>Das ComB-DNA-Aufnahmesystem hat keinen Einfluss auf die Länge der DNA-Importe</i>	<i>108</i>
5.10	<i>RecA ist essentiell für die Rekombination in H. pylori</i>	<i>110</i>
5.11	<i>Das recB-Homolog HP1553 spielt eine wichtige Rolle in der Rekombination von H. pylori</i>	<i>111</i>
5.12	<i>RecG, RecN und RecR haben verschiedene regulatorische Funktionen in der homologen Rekombination von H. pylori</i>	<i>112</i>

5.13	<i>Exonuklease VII limitiert die homologe Rekombination</i>	<i>115</i>
5.14	<i>Glykosylasen erfüllen in H. pylori wichtige Aufgaben im Schutz vor Mutationen.</i>	<i>116</i>
5.15	<i>DNA-Glykosylasen beeinflussen die Rekombination in H. pylori</i>	<i>116</i>
5.16	<i>Die Überexpression von mutY führt zu einer höheren Anzahl an ISR in der importierten Donor-DNA.....</i>	<i>118</i>
5.17	<i>Schlussbetrachtung</i>	<i>122</i>
6	Literatur	123
	Danksagung	144
	Publikationen	145
	Lebenslauf.....	147
	Erklärung zur Dissertation	148

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Migration von <i>H. pylori</i> im Zuge der Völkerwanderungen.....	12
Abbildung 2: Schema des Aufbaus des ComB DNA-Aufnahmesystems von <i>H. pylori</i>	13
Abbildung 3: Modell des Ablaufs der homologen Rekombination	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung der verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen in Bakterien.....	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines allelspezifischen Primers	38
Abbildung 6: Herstellung eines Plasmids zur Inaktivierung des Gens <i>comB10</i> in <i>H. pylori</i> ...	49
Abbildung 7: Mutationsfrequenzen der <i>H. pylori</i> Wildtyp-Stämme	59
Abbildung 8: Mutationsfrequenzen der <i>H. pylori</i> Wildtyp-Stämme und <i>mutY</i> -Mutanten.....	61
Abbildung 9: Analyse der <i>mutY</i> -mRNA-Konzentration in den <i>H. pylori</i> -Stämmen 26695 und 26695 <i>mutY</i> comp mittels semiquantitativer RT-PCR	62
Abbildung 10: Effekt der Komplementierung des <i>mutY</i> -Gens auf die Mutationsfrequenz.....	63
Abbildung 11: Rif-Resistenz verleihende Punktmutationen im <i>rpoB</i> -Gen von <i>H. pylori</i>	64
Abbildung 12: Verteilung der Rif-Resistenz verleihenden Punktmutationen in <i>H. pylori</i> Wildtyp-Stämmen und <i>mutY</i> -Mutanten	65
Abbildung 13: Wachstumskurven von <i>H. pylori</i> -Stämmen mit und ohne Rif-Resistenz vermittelnde Punktmutation.....	68
Abbildung 14: Relative Anzahl der <i>H. pylori</i> -Stämme 26695 und 26695 <i>mutY</i> während der Ko-Kultivierung der Bakterien	70
Abbildung 15: Verteilung der Rif-Resistenz verleihenden Punktmutationen in den <i>H. pylori</i> -Isolaten Ala15 und SA166A	71
Abbildung 16: Schematische Darstellung des <i>in vitro</i> -Transformationssystems zur Analyse der DNA-Importe und Transformation in <i>H. pylori</i>	73

Abbildung 17: Frequenzen Rif-resistenter Klone nach Inkubation mit Donor-DNA.....	74
Abbildung 18: Schematische Darstellung der Sequenz Rif-resistenter Klone des Stammes 26695 nach Transformation mit J99-R3 Donor-DNA	77
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Sequenz Rif-resistenter Klone des Stammes N6 nach Transformation mit J99-R3 Donor-DNA	78
Abbildung 20: PCR-Produkt des J99-R3 <i>rpoB</i> -Gens zur Transformation des Stammes 26695	80
Abbildung 21: Mutationsfrequenzen der 26695-Mutanten	89
Abbildung 22: Frequenzen Rif-resistenter Klone der 26695-Mutanten nach Inkubation mit J99-R3 Donor-DNA.....	90
Abbildung 23: Schematische Darstellung der Sequenz Rif-resistenter Klone des Stammes 26695 <i>mutY</i> nach Transformation mit J99-R3 Donor-DNA	92
Abbildung 24: Frequenzen Rif-resistenter Zellen nach Inkubation der Stämme 26695, 26695 <i>mutY</i> und 26695 <i>mutY</i> comp mit J99-R3 Donor-DNA	94
Abbildung 25: Schematische Darstellung der Sequenz Rif-resistenter Klone des Stammes 26695 <i>mutY</i> comp nach Transformation mit J99-R3 Donor-DNA	95
Abbildung 26: Hypothetisches Modell der Bildung von ISR in <i>H. pylori</i>	120

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: An der Rekombination beteiligte Enzyme von <i>E. coli</i> und ihre Funktion	14
Tabelle 2: Geräteliste	26
Tabelle 3: <i>H. pylori</i> -Wildtyp-Stämme und <i>H. pylori</i> -Mutanten	27
Tabelle 4: <i>E. coli</i> -Stämme	28
Tabelle 5: Plasmide	28
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Primer	30
Tabelle 7: Standardreaktionsansatz einer PCR	37
Tabelle 8: Temperaturprofil einer Standard-PCR	37
Tabelle 9: Standardreaktionsansatz einer Sequenzierreaktion	40
Tabelle 10: Temperaturprofil der Kettenabbruchreaktion	40
Tabelle 11: Durchführung der reversen Transkription	42
Tabelle 12: Reaktionsansatz einer semiquantitativen PCR	43
Tabelle 13: Reaktionsansatz der <i>mutY</i> „Real-Time“-PCR	44
Tabelle 14: Temperaturprofil der quantitativen „Real-Time“-PCR	44
Tabelle 15: Standard-Restriktionsansatz	45
Tabelle 16: Reaktionsansatz zur Dephosphorylierung von DNA-Enden	45
Tabelle 17: Primer und Plasmide zur Inaktivierung von <i>H. pylori</i> -Genen	48
Tabelle 18: Auf die Beteiligung an der Entstehung von ISR untersuchte Erkennungssequenzen für Restriktions-Modifikations-Systeme in <i>H. pylori</i>	56
Tabelle 19: Programme zur Editierung und Analyse von DNA- und Proteinsequenzen	57
Tabelle 20: Datenbanken und Sequenzvergleiche	58

Tabelle 21: Statistische Analysen und Grafikprogramme.....	58
Tabelle 23: Abschätzung der mittleren Importlängen von <i>H. pylori</i> Wildtyp-Stämmen mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode	76
Tabelle 24: Länge der DNA-Importe 5'-wärts und 3'-wärts von der Rif-Resistenz vermittelnden Punktmutation des Donors.....	76
Tabelle 25: Anzahl der Klone mit ISR und Abschätzung der ISR-Längen von <i>H. pylori</i> Wildtyp-Stämmen	79
Tabelle 26: Mutations- und Rekombinationsfrequenzen der 26695 <i>comB10</i> -Mutante	81
Tabelle 27: Importlänge und Bildung von ISR in der 26695 <i>comB10</i> -Mutante nach natürlicher Transformation bzw. Elektroporation mit J99-R3 Donor-DNA	83
Tabelle 28: Mutations- und Rekombinationsfrequenzen der 26695 <i>recA</i> -Mutante	84
Tabelle 29: Importlänge und ISR des Stammes 26695 <i>recB</i> nach Transformation mit J99-R3	85
Tabelle 30: Importlänge und ISR des Stammes 26695 <i>recG</i> nach Transformation mit J99-R3	86
Tabelle 31: Importlänge und ISR in den Einzelgenmutanten 26695 <i>recJ</i> , 26695 <i>xseA</i> und der Doppelmutante 26695 <i>recJxseA</i> nach Transformation mit J99-R3	87
Tabelle 32: Importlänge und ISR der Stämme 26695 <i>recN</i> und 26695 <i>recR</i> nach Transformation mit J99-R3.....	88
Tabelle 33: Importlänge und ISR der Stämme 26695 <i>nth</i> , 26695 <i>ung</i> und 26695 <i>xth</i> nach Transformation mit J99-R3	89
Tabelle 34: Importlänge und ISR der Stämme 26695 <i>mutY</i> und 26695 <i>mutYcomp</i> nach Transformation mit J99-R3	93
Tabelle 35: Anzahl und Art ausgetauschter Nukleotide in ISR der Stämme 26695, 26695 <i>mutY</i> und 26695 <i>mutYcomp</i>	121

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AP	Apurin/Apyrimidin
Amp ^r	Ampicillin-resistent
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
BHI	Brain-Heart-Infusion-Medium
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	„complementary“ DNA
Cm ^r	Chloramphenicol-resistent
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G	Guanin
8-OxoG	8-Oxo-7,8-dihydroguanin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ISR	“Interspersed sequence of the recipient”
Km ^r	Kanamycin-resistent

LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
μl	Mikroliter
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	“messenger” RNA
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
Ω	Ohm
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PPI	Protonenpumpeninhibitor
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
Rif	Rifampicin
Rif ^r	Rifampicin-resistent
RM	Restriktions-Modifikations-System
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
SNP	Einzelner Nukleotidpolymorphismus

T	Thymin
u	Unit
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Das Humanpathogen *Helicobacter pylori*

1.1.1 Historie des Erregers

Trotz erster Beschreibungen spiralig gewundener Bakterien in Proben aus Tiermägen (Bottcher, 1874) und aus dem menschlichen Magen (Jaworski, 1899; Konturek, 2003) galt der Magen aufgrund seines sauren Milieus mit einem pH-Wert zwischen eins und zwei bis in das 20. Jahrhundert als steril und die dort vorgefundenen Bakterien wurden als Kontaminationen aus dem Mund- und Rachenraum betrachtet. Als Ursache für peptische Ulzera wurde unter anderem Hyperazidität aufgrund von Stress angesehen. Erst 1979 wurde die Idee der Besiedelung des Magens wieder neu aufgegriffen und spiralförmige Bakterien auf der Oberfläche von Epithelzellen im Lumen des menschlichen Magens nachgewiesen (Fung *et al.*, 1979). Jedoch war es nicht möglich, diese Bakterien zu kultivieren.

Die beiden australischen Ärzte Barry Marshall und Robin Warren schafften es dann 1982 erstmals, ein Bakterium aus Biopsiematerial des Magens zu isolieren und erfolgreich zu kultivieren (Marshall und Warren, 1984; Warren und Marshall, 1983). Morphologische Gemeinsamkeiten und die Übereinstimmung des GC-Gehaltes führten zur Einstufung des Bakteriums in die Gattung *Campylobacter* und das Bakterium wurde als *Campylobacter pyloridis* bezeichnet (Marshall und Warren, 1984), aus Nomenklaturgründen später aber *Campylobacter pylori* benannt (Marshall und Goodwin, 1987). Nachdem weitere Untersuchungen des Bakteriums zeigten, dass sich eine Eingruppierung in die Gattung *Campylobacter* nicht aufrecht erhalten ließ, wurde das Bakterium in die neue Gattung *Helicobacter* innerhalb der ϵ -*Proteobacteria* eingeordnet (Goodwin *et al.*, 1989) und seitdem als *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) bezeichnet. Der Name *Helicobacter* wurde dabei aus der spiraligen Form der Bakterien abgeleitet (helix, helicos, griechisch: Windung).

Marshall und Warren vermuteten, dass *H. pylori* mitverantwortlich für die Entstehung der peptischen Ulzera sei und schlugen zur Therapie eine Antibiotika-Behandlung vor. Die Diskussionen, welche durch diese Äußerung angeregt wurden, veranlassten Marshall und Morris dazu, den Beweis für die Pathogenität des Bakteriums durch einen Selbstversuch zu erbringen. Sie nahmen *H. pylori* oral auf und entwickelten daraufhin eine akute Gastritis, die nach Behandlung mit Antibiotika wieder zurückging (Marshall *et al.*, 1985; Morris und

Nicholson, 1987). Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass das Bakterium *H. pylori* den menschlichen Magen kolonisieren kann und gleichzeitig wurden die Kochschen Postulate zum Nachweis eines Erregers erfüllt.

1.1.2 Mikrobiologie und Klinik

Die Gattung *Helicobacter* gehört zur Familie der *Helicobacteraceae* in der Gruppe der ϵ -*Proteobacteria*. Zu dieser Gattung gehören mittlerweile mehr als 25 *Helicobacter*-Arten, die sich abhängig von ihrer ökologischen Nische in die gastrischen und die enterohepatischen *Helicobacter* unterteilen lassen und eine hohe Organspezifität aufweisen (Fox, 2002; Solnick und Schauer, 2001). Gastrische Arten wie *H. pylori* besiedeln ausschließlich den Magen, enterohepatische Arten wie *H. hepaticus* kolonisieren vorwiegend den Darmtrakt, wurden aber auch in Leber und Gallenwegen gefunden. Für einige enterohepatische *Helicobacter*-Arten ist eine Assoziation mit Hepatitis, Lebertumoren und entzündlichen Darmerkrankungen beschrieben worden (Fox *et al.*, 1994; Ge *et al.*, 2008; Suerbaum *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 1994). *H. pylori* gehört in die Gruppe der gastrischen *Helicobacter*, wie auch die Arten *H. acinonychis*, *H. felis* und *H. mustelae*, die in Katzen, Großkatzen, Frettchen, Hunden und anderen Säugetieren vorkommen (Eaton *et al.*, 1993; Fox *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1988; Solnick *et al.*, 1993; Solnick, 2003). Die Bakterien dieser Gruppe sind alle Urease-positiv und stark beweglich (Solnick und Schauer, 2001).

Bei *Helicobacter pylori* handelt es sich um ein spiralig gekrümmtes, Gram-negatives Bakterium mit einer Länge von 2 bis 4 μm und einem Durchmesser von 0,5 bis 1 μm . *H. pylori* ist lophotrich mit vier bis sechs von einer Membran umgebenen Flagellen begeißelt (Josenhans und Suerbaum, 2001). Neben der Stäbchenform können die Bakterien nach längerer Kultur oder Behandlung mit Antibiotika über verschiedene Zwischenstadien eine kokkoide Form annehmen, welche nicht weiter kultivierbar ist (Kusters *et al.*, 1997). Ob es sich bei dieser Form um eine Art Dauerstadium handelt, konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Zum Wachstum benötigt *H. pylori* eine mikroaerobe Atmosphäre mit einem Sauerstoff-Gehalt zwischen 2% und 5% sowie einen Kohlendioxid-Gehalt zwischen 5% und 10% bei hoher Feuchtigkeit. Ein optimales Wachstum des Bakteriums erfolgt bei 37°C, wobei nur geringe Abweichungen zwischen 1°C und 3°C von ihm toleriert werden. *H. pylori* kolonisiert Bereiche des Magens, in denen der pH-Wert zwischen 5,5 und 8,0 liegt, toleriert aber

kurzzeitig auch pH-Werte, die deutlich unter diesem Bereich liegen (Scott *et al.*, 2002; Stingl *et al.*, 2002b). Für die Kultivierung von *H. pylori* werden komplexe Nährmedien benötigt. Diese basieren oftmals auf Columbia-Agar (Festmedien) oder BHI-Medium (Flüssigmedium; BHI, englisch „brain-heart-infusion“) und werden zusätzlich mit 2% bis 10% lysierten Blut bzw. Serum versetzt. Der hohe Bedarf an Nährstoffen ist durch das Fehlen einiger Biosynthesewege bei *H. pylori* zu erklären, z.B. die Biosynthese der Aminosäuren Arginin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin und Valin (Nedenskov, 1994; Reynolds und Penn, 1994). Die „Einsparung“ von Biosynthesewegen beruht wahrscheinlich auf dem hohen Anpassungsgrad an das Habitat menschlicher Magen und der damit verbundenen Verfügbarkeit an Substanzen (Berg *et al.*, 1997; Doig *et al.*, 1999; Marais *et al.*, 1999).

Zur Energiegewinnung nutzt *H. pylori* Glukose als Kohlenstoffquelle, die über den 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Weg und den Pentosephosphat-Weg abgebaut wird. Als terminaler Elektronen-Akzeptor dient Sauerstoff, allerdings gibt es Hinweise darauf, dass auch Fumarat als alternativer Elektronen-Akzeptor verwendet werden kann (Smith und Edwards, 1995). Anhand genomischer und experimenteller Untersuchungen ist nicht davon auszugehen, dass *H. pylori* in der Lage ist, andere Zucker zu katabolisieren (Berg *et al.*, 1997; Doig *et al.*, 1995; Marais *et al.*, 1999; Nedenskov, 1994). Es bleibt zu berücksichtigen, dass viele Annahmen über den Metabolismus von *H. pylori* auf der Grundlage von Analysen der vorhandenen Genomsequenzen beruhen und die experimentellen Beweise noch zu erbringen bleiben (Alm *et al.*, 1999; Kelly, 1998; Marais *et al.*, 1999; Tomb *et al.*, 1997).

H. pylori ist einer der meist verbreiteten Humanpathogene. Die globale Durchseuchungsrate liegt bei etwa 50% der Bevölkerung, wobei die Durchseuchung in Entwicklungsländern mit teilweise über 80% deutlich höher ist als in Industrieländern mit 25-50% (Dunn *et al.*, 1997; Feldman, 2001; Pounder und Ng, 1995). Besonders stark macht sich der Unterschied bei Kindern bemerkbar, mit einer positiven Diagnostik bei über 50% der untersuchten Kinder in Entwicklungsländern, im Gegensatz zu weniger als 10% als positiv getesteter Kinder in den Industrienationen (Daugule und Rowland, 2008; Dunn *et al.*, 1997). Dabei wurde gezeigt, dass vor allem sozioökonomische Aspekte und dadurch bedingte unterschiedliche Hygienebedingungen für diese Unterschiede verantwortlich sind (Banatvala *et al.*, 1993; Malaty und Graham, 1994; Parsonnet, 1995).

Trotz der hohen Prävalenz von *H. pylori* ist der genaue Infektionsweg des Bakteriums noch nicht geklärt. Obwohl es einzelne Funde von *H. pylori* in Haustieren gibt (Brown *et al.*, 2001;

Brown *et al.*, 2002; Dore *et al.*, 2001), gilt eine zoonotische Übertragung eher als unwahrscheinlich. Stattdessen wird angenommen, dass eine Erstinfektion über eine direkte oral-orale oder fäkal-orale Mensch-zu-Mensch Übertragung zustande kommt (Leung *et al.*, 1999; Parsonnet *et al.*, 1999). Die Infektion findet meist in der frühen Kindheit durch den engen Kontakt mit infizierten Personen statt und besteht ohne eine Antibiotikatherapie ein Leben lang (Raymond *et al.*, 2004; Rowland *et al.*, 1999; Rowland *et al.*, 2006; Schwarz *et al.*, 2008). Obwohl die Infektion fast immer zu einer chronischen Entzündung der Magenschleimhaut führt (Dooley *et al.*, 1989; McColl, 1997), zeigen nur 10% bis 20% der betroffenen Personen Folgesymptome, wie die Ausprägung eines Ulcus duodeni oder Ulcus ventriculi. Bei etwa 1% der Infizierten kommt es zur Ausbildung von Magenkarzinomen oder gastrischen MALT-Lymphomen (MALT, englisch: „mucosa associated lymphoid tissue“) (Ernst und Gold, 2000; Kuipers, 1999; Suerbaum und Michetti, 2002; Uemura *et al.*, 2001; Walsh und Peterson, 1995). Ob die Infektion mit *H. pylori* asymptomatisch bleibt oder ob sich mit *H. pylori*-assoziierte Folgeerkrankungen bilden, hängt im Wesentlichen von den Virulenzeigenschaften des *H. pylori*-Stammes, dem Immunstatus und der genetischen Prädisposition des Patienten sowie von Umweltfaktoren (z.B. Ernährung) in der Umgebung des Patienten ab (Blaser und Berg, 2001). Mittlerweile gibt es eine Vielzahl an diagnostischen Untersuchungsmethoden. Wenn eine Endoskopie durchgeführt wird, kann aus einer Magenbiopsie neben einem Nachweis der Erreger durch histologische Untersuchungen ein Urease-Schnelltest durchgeführt werden, mit dem das Vorhandensein der Urease getestet wird und somit *H. pylori* indirekt nachgewiesen werden kann. Den Gold-Standard stellt noch immer die Kultivierung des Erregers aus Biopsiematerial dar, die zusätzlich Voraussetzung für die Testung der Antibiotikaresistenz ist. Aber auch nicht-invasive Methoden wie der ¹³C-Harnstoff-Atemtest und der Stuhl-Antigen-Test gewährleisten eine sichere Diagnostik (Granstrom *et al.*, 2008; Vaira *et al.*, 1999; Zagari *et al.*, 1999).

Obwohl es durch die Infektion mit *H. pylori* zu schweren Krankheitsbildern wie Magenkarzinom oder MALT-Lymphom kommen kann, wird eine Eradikation des Bakteriums in aktuellen Leitlinien nicht generell sondern nur bei bestimmten definierten Indikationen empfohlen. Zu den gesicherten Indikationen gehören die peptische Ulkuskrankheit und das maligne MALT-Lymphom (Malfertheiner *et al.*, 2007). Dazu werden Patienten bei einer Ersttherapie mit drei verschiedenen Substanzen behandelt, beispielsweise mit der Kombination aus einem Protonenpumpen-Inhibitor mit zwei Antibiotika (Clarithromycin und Metronidazol oder Amoxicillin). Führt die Erstbehandlung nicht zu einer Eradikation der

Infektion, stehen verschiedene Zweitlinientherapie-Schemata zur Verfügung (Malfertheiner *et al.*, 2007).

1.2 Virulenzfaktoren von *H. pylori*

Verschiedene bakterielle Komponenten bestimmen die Pathogenität und Virulenz des Erregers und werden unter dem allgemeinen Begriff „Virulenzfaktoren“ zusammengefasst. Diese Faktoren lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen: Adhäsine (Adhärenz an Zielzellen), Invasine (Eindringen in Zielzellen), Mechanismen zur Umgehung der Infektabwehr (z.B. molekulare Mimikry), Agressine (z.B. Toxine) und Moduline (Induktion einer übermäßigen Immunreaktion) (Finlay und Falkow, 1997; Webb und Kahler, 2008). Auch bei der Infektion mit *H. pylori* spielen verschiedene Virulenzfaktoren eine wichtige Rolle. Dabei ist zu beachten, dass das Vorhandensein einzelner Faktoren in *H. pylori* sehr stark zwischen unterschiedlichen Stämmen variieren kann. Im Folgenden soll auf einige der wichtigsten Virulenzdeterminanten von *H. pylori* eingegangen werden.

Motilität

Die Motilität von *H. pylori* wird durch vier bis sechs Flagellen gewährleistet (Josenhans und Suerbaum, 2001). Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der Kolonisierung des Wirtes (Eaton *et al.*, 1996). Dabei ist die Beweglichkeit der Bakterien zum einen während der Durchquerung des Lumens notwendig, zum anderen müssen nicht-adhärente Bakterien ständig dem Strom der Mukussekretion entgegen wirken, um nicht weggespült zu werden. Die Flagellenfilamente bestehen aus den zwei Untereinheiten FlaA und FlaB (Josenhans *et al.*, 1995; Kostrzynska *et al.*, 1991; Suerbaum *et al.*, 1993) und sind von einer Membranhülle umgeben, die dem Schutz der Proteine vor den niedrigen pH-Werten des Magens dienen könnte (Geis *et al.*, 1993) und der äußeren Membran sehr ähnlich ist. Die Steuerung der Bewegung erfolgt über vier Chemosensoren. Für den Sensor TlpB wurde beschrieben, dass er eine Rolle in der pH-Taxis spielt (Croxen *et al.*, 2006). Kürzlich wurde eine Funktion des Sensors TlpD in der Energie-Taxis von *H. pylori* beschrieben (Schweinitzer *et al.*, 2008).

Urease

Auch wenn sich *H. pylori* bevorzugt in der Mucus-Schicht nahe der Epithelzellen im Antrum des menschlichen Magens ansiedelt, in der der pH-Wert zwischen ~4,0 und 6,5 liegt

(Schreiber *et al.*, 2000; Schreiber *et al.*, 2004), muss das Bakterium während der Infektion die Passage durch den stark sauren Magensaft überstehen (Sachs *et al.*, 2003). Um dieses zu ermöglichen, erzeugt das Bakterium Ammoniak (NH_3), welches durch das Abfangen von Protonen den pH-Wert in der unmittelbaren Umgebung des Bakteriums erhöht. Das NH_3 wird durch die Hydrolyse von Harnstoff mit Hilfe des Enzyms Urease katalysiert. Urease ist ein Nickel-haltiges Hexamer, welches sich aus den beiden Untereinheiten UreA und UreB zusammensetzt (Dunn *et al.*, 1990; Hu und Mobley, 1990). Das Enzym wird in sehr großen Mengen vom Bakterium gebildet und liegt sowohl zytoplasmatisch als auch Membran-assoziiert vor (Bauerfeind *et al.*, 1997; Hawtin *et al.*, 1990; Stingl *et al.*, 2002a). Seine große Bedeutung als Virulenzfaktor wurde in Tierexperimenten gezeigt, in denen Urease-negative *H. pylori*-Mutanten nicht in der Lage waren, die Mägen der Tiere zu kolonisieren (Eaton *et al.*, 1991; Eaton und Krakowka, 1994).

Die *cag*-Pathogenitätsinsel und CagA

Die *cag*-Pathogenitätsinsel ist ein über 30 kb großes Element im *H. pylori*-Genom, welches bis zu 32 Gene beinhaltet, die teilweise eine wichtige Rolle in der Pathogenität des Bakteriums spielen (Akopyants *et al.*, 1998; Censini *et al.*, 1996). Die Insel ist eine äußerst variable Region, in der die Anzahl an Genen zwischen verschiedenen Stämmen stark variieren kann und die während einer chronischen Kolonisierung auch ganz oder teilweise verloren gehen kann (Bjorkholm *et al.*, 2001a; Kraft *et al.*, 2006). Der vom restlichen Genom abweichende G+C-Gehalt und die Begrenzung mit terminalen repetitiven Sequenzen lassen vermuten, dass die Pathogenitätsinsel durch horizontalen Gentransfer in das Genom integriert wurde (Hacker *et al.*, 1997; Tomb *et al.*, 1997). Gene der Insel kodieren unter anderen für Komponenten eines Typ-IV-Sekretionssystems (T4SS) (Bourzac und Guillemin, 2005; Fischer *et al.*, 2001b), welches den Transport des CagA-Proteins (englisch: „cytotoxin associated gene“) in das Zytoplasma von Epithelzellen des Magens vermittelt (Odenbreit *et al.*, 2000). Das CagA-Protein wurde Anfang der 1990iger Jahre entdeckt (Covacci *et al.*, 1993; Cover *et al.*, 1990; Crabtree *et al.*, 1991). Es konnte gezeigt werden, dass in westlichen Nationen Patienten, die mit einem *cagA*-positiven Stamm infiziert sind, ein höheres Risiko haben, ein peptisches Ulkus oder ein Magenkarzinom zu entwickeln als Patienten die mit einem *cagA*-negativen Stamm infiziert sind (Blaser und Crabtree, 1996; Kuipers *et al.*, 1995). Für Patienten asiatischer Länder gilt dieser Zusammenhang allerdings nicht (Go und Graham, 1996; Hamlet *et al.*, 1999). In den asiatischen Ländern gibt es starke regionale Differenzen in

der Häufigkeit der Entwicklung eines Magenkarzinoms in Patienten, die mit einem *cagA*-positiven *H. pylori*-Stamm infiziert sind (Nguyen *et al.*, 2008). Diese Differenzen könnten auf Unterschiede der Allele des *cagA*-Gens zurück zu führen sein (Higashi *et al.*, 2002). Weiterhin konnte durch Untersuchungen in Zellkulturen und Tiermodellen eine Beteiligung des Proteins in der Pathogenese von *H. pylori* nachgewiesen werden (Covacci und Rappuoli, 2000; Hatakeyama, 2008; Rieder *et al.*, 2005) und erst kürzlich wurde eine direkte onkogene Wirkung von CagA in transgenen Mäusen gezeigt, die das *cagA*-Gen exprimierten (Ohnishi *et al.*, 2008). In den Epithelzellen wird CagA durch zelluläre Kinasen phosphoryliert (Poppe *et al.*, 2006; Stein *et al.*, 2002) und bindet dann an verschiedenen Wirtsproteine, was zu einer morphologischen Veränderung der Epithelzellen führt (Hatakeyama, 2004; Naumann, 2005). Die Interaktion des T4SS mit der Wirtszelle führt zu einer Aktivierung proinflammatorischer Signalketten und zur Ausschüttung von Cytokinen (Odenbreit *et al.*, 2000). An der Induktion dieser Antwort sind sowohl das CagA-Protein selbst als auch der Transfer von Peptidoglykan über das T4SS verantwortlich (Viala *et al.*, 2004). Neben *cagA* zeigen auch weitere Gene der *cag*-Pathogenitätsinsel eine hohe stammspezifische Diversität. So variiert die Länge und die Aminosäure-Zusammensetzung des Proteins CagY aufgrund zweier repetitiver Regionen im kodierenden Gen *cagY* (Aras *et al.*, 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass die Oberflächen-exponierte Region des Proteins CagC, eine essentielle Komponente des *cag*-T4SS von *H. pylori*, stark zwischen verschiedenen Stämmen variiert (Andrzejewska *et al.*, 2006; Rohde *et al.*, 2003).

Das vakuolisierende Zytotoxin VacA

Eine wichtige Rolle in der Pathogenität von *H. pylori* spielt das vakuolisierende Zytotoxin VacA, welches von den meisten Stämmen sezerniert wird und wahrscheinlich mit für die Ausbildung der peptischen Ulzera und des Magenkarzinoms verantwortlich ist, auch wenn diese Hypothese letztlich noch nicht bewiesen werden konnte (Atherton *et al.*, 1995; Cover und Blaser, 1992; Ogura *et al.*, 2000). VacA führt unter anderem zu einer starken Vakuolisierung in Epithelzellen (Cover und Blanke, 2005; Leunk *et al.*, 1988) und hemmt die Proliferation von T-Zellen (Gebert *et al.*, 2003). Das Exotoxin bildet Poren in der Zellmembran von Epithelzellen und bewirkt so die Freisetzung von Nährstoffen, Harnstoff sowie Anionen und Kationen (Montecucco und De Bernard, 2003). VacA kann in das Zytosol der Wirtszelle eindringen und dort die Mitochondrien schädigen, so dass die Apoptose der Zelle eingeleitet wird (Cover *et al.*, 2003; Galmiche *et al.*, 2000). Das *vacA*-Gen weist

aufgrund einer Mosaikstruktur von konservierten und variablen Segmenten eine hohe allelische Vielfalt auf (Aviles-Jimenez *et al.*, 2004; Carroll *et al.*, 2004; Cover *et al.*, 1994). Dabei unterscheiden sich verschiedene Alleltypen in ihrer Affinität zu zellulären Rezeptoren (Atherton *et al.*, 1995) und es wurde gezeigt, dass ein bestimmter Alleltyp der *vacA* i-Region stark mit dem Auftreten von Adenokarzinomen assoziiert ist (Rhead *et al.*, 2007).

Lipopolysaccharide, Adhäsine und Membranproteine

Der Molekülkomplex der Lipopolysaccharide (LPS) wirkt bei vielen Bakterien als starkes Endotoxin. Im Gegensatz dazu ist die Aktivierung der Immunantwort durch *H. pylori*-LPS sehr schwach (Muotiala *et al.*, 1992). *H. pylori*- und *H. hepaticus*-LPS können sogar die durch *E. coli*-LPS hervorgerufene Immunantwort unterdrücken (Lepper *et al.*, 2005; Sterzenbach *et al.*, 2007), was als Vorteil bei der chronischen Infektion des Wirtes gesehen werden kann. Die O-Antigen-Seitenketten des LPS von *H. pylori* weisen starke Ähnlichkeiten mit den menschlichen Lewis-Antigenen auf. Eine solche molekulare Mimikry könnte eine wichtige Voraussetzung für eine langfristige Persistenz im Wirt darstellen (Appelmek *et al.*, 1996; Aspinall und Monteiro, 1996; Monteiro *et al.*, 1998). Das LPS zeigt eine hohe phänotypische Variabilität, die zu einer großen Vielfalt an LPS-Strukturen innerhalb einer Population führt, wodurch es der Immunantwort des Wirtes zusätzlich erschwert wird, *H. pylori* anzugreifen (Appelmek *et al.*, 1999). Ermöglicht wird diese Vielfalt u.a. durch das An- bzw. Abschalten dreier Gene; *futA*, *futB* und *futC*, mittels Leseraster-Verschiebungen während der Transkription der Gene (Nilsson *et al.*, 2006; Nilsson *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2000).

Hop-Proteine (Hop, englisch: „*Helicobacter* outer membrane proteins“) stellen wichtige Strukturen auf der Oberfläche der äußeren Membran dar. Zu ihnen gehören verschiedene Porine sowie die Adhäsine BabA und SabA, welche es *H. pylori* ermöglichen an humane Epithelzellen zu adhären. Als Rezeptor für das Adhäsine BabA fungiert das fukosylierte Blutgruppen-Antigen Lewis^b (Boren *et al.*, 1993; Ilver *et al.*, 1998). Durch intragenomische Rekombination zwischen dem *babA*-Gen und *babB* kann es zu einem Verlust der Adhärenz an Lewis^b kommen oder auch ein inaktiviertes *babA* wieder aktiviert werden und so die Adhärenz an Lewis^b wieder hergestellt werden (Backstrom *et al.*, 2004; Solnick *et al.*, 2004).

SabA bindet an die sialysierten Lewis-Antigene Sialyl-Lewis^a und Sialyl-Lewis^x (Mahdavi *et al.*, 2002). Diese Antigene werden verstärkt nach einer Kolonisierung der Epithelzellschicht

von *H. pylori* gebildet (Ota *et al.*, 1998), so dass SabA vermutlich zur Persistenz der *H. pylori*-Infektion beiträgt. Das *sabA*-Gen wird wahrscheinlich durch Phasenvariation reguliert, die durch einen CT-Dinukleotid-„Repeat“ am 5'-Terminus des Gens hervorgerufen wird. Die Regulation von *babA* und *sabA* spielt vermutlich eine Rolle, um die Oberflächenproteine des Bakteriums zu modulieren und so der Abwehr des Wirtes auszuweichen.

Ein weiterer entscheidender Faktor, welcher für die Virulenz von *H. pylori* verantwortlich ist, ist seine hohe Variabilität. Diese wird stark durch DNA-Reparatur- und Rekombinationsmechanismen bestimmt, welche im Fokus dieser Arbeit stehen und aus diesem Grund in Abschnitt 1.4 ausführlicher beschrieben werden.

1.3 Diversität und Populationsstruktur von *H. pylori*

1.3.1 Genetische und genomische Variabilität

Durch die Untersuchungen verschiedener *H. pylori*-Isolate mittels „Fingerprinting“-Methoden wie RAPD-PCR (RAPD, englisch: „random amplification of polymorphic DNA“) oder RFLP (Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus) wurde schon sehr früh gezeigt, dass das Bakterium eine ungewöhnlich hohe genetische Diversität besitzt (Akopyanz *et al.*, 1992a; Akopyanz *et al.*, 1992b; Kansau *et al.*, 1996; Langenberg *et al.*, 1986; Majewski und Goodwin, 1988). Die Variabilität des Bakteriums ist deutlich höher als in allen anderen bisher untersuchten Bakterienarten, so dass fast jedes Isolat seinen spezifischen molekularen Fingerabdruck aufweist.

Auch Vergleiche der DNA-Sequenzen von Genen des Grundstoffwechsels („Housekeeping“-Gene) bestätigten die genetischen Unterschiede zwischen verschiedenen Isolaten. Es zeigte sich, dass die Diversität so hoch ist, dass nahezu jeder Patient von einem oder mehreren einzigartigen Stämmen kolonisiert wird (Suerbaum *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1995), die für fast jedes Gen ihr eigenes stammspezifisches Allel aufweisen. Für diese hohe Variabilität des Bakteriums sind mehrere Faktoren verantwortlich. So weist *H. pylori* eine durchschnittliche Mutationsrate von ca. 10^{-6} auf, die damit deutlich über der Mutationsrate der *Enterobacteriaceae* liegt. Etwa ein Viertel der *H. pylori*-Stämme besitzt sogar Mutationsraten, welche über denen von *E. coli*-Mutatorstämmen mit einem defekten „Mismatch“-

Reparatursystem (mismatch, englisch: Fehlpaarung) liegen (Bjorkholm *et al.*, 2001b; Horst *et al.*, 1999). Der Grund für die außergewöhnlich hohe Anzahl an *de novo* Mutationen ist vermutlich das Fehlen einiger DNA-Reparaturmechanismen, wie der „Mismatch“-Reparatur (Suerbaum, 2000). Nähere Analysen der Nukleotid-Polymorphismen in „Housekeeping“- und Virulenzgenen zeigten, dass es sich bei den Mutationen zumeist um synonyme Substitutionen handelte, die keine Änderungen in der Aminosäurezusammensetzung der Proteine herbeiführen (Achtman *et al.*, 1999).

Ein weiterer Faktor, der die Diversität von *H. pylori* stark beeinflusst, ist eine starke Durchmischung der Allele einer Population durch die natürliche Kompetenz des Bakteriums und eine damit verbundene hohe Frequenz an Rekombinationsereignissen (Falush *et al.*, 2001). Nachgewiesen wurde die Bedeutung der Rekombination in der Entstehung der allelischen Vielfalt von *H. pylori* unter anderen durch die Anwendung des Homoplasie-Tests (Maynard und Smith, 1998). Bei dem Test handelt es sich um ein statistisches Werkzeug, welches es ermöglicht die Bedeutung der Rekombination bei der Entstehung der genetischen Diversität abzuschätzen. Dabei werden die Sequenzen von verschiedenen Allelen eines Gens darauf untersucht, ob Nukleotidunterschiede unabhängig voneinander durch Mutationen entstanden sind oder ob sie aus Rekombinationsereignissen hervorgegangen sind. Der Test kann Werte zwischen 0,0 (Klonalität innerhalb der Population) und 1,0 (freie Rekombination innerhalb der Population) einnehmen. Die Analyse dreier Genfragmente (*flaA*, *flaB* und *vacA*) von Isolaten aus Deutschland und Kanada ergab für *H. pylori* einen mittleren Wert von 0,85 und spricht dafür, dass die Diversität des Bakteriums vor allem durch Rekombination während einer gemischten Infektion mit mehreren Stämmen erzeugt wird (Israel *et al.*, 2001; Kersulyte *et al.*, 1999; Suerbaum *et al.*, 1998). Durch Sequenzanalysen von zehn Genfragmenten sequenzieller Isolate konnte weiterhin gezeigt werden, dass die durchschnittliche Länge der DNA-Importe ins Genom von *H. pylori* 417 Bp beträgt (Falush *et al.*, 2001). Dieser Wert ist ausgesprochen klein im Vergleich zu anderen Bakterien. Beispielsweise liegt die Länge der DNA-Importe in *Streptococcus pneumoniae* bei etwa 2 kb und in *E. coli* und *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) bei mehr als 10 kb (Fornili und Fox, 1977; Guild *et al.*, 1968; McKane und Milkman, 1995).

Durch die Sequenzierung dreier kompletter *H. pylori*-Genome wurde es möglich, detaillierte Untersuchungen der Diversität zwischen diesen *H. pylori*-Stämmen durchzuführen (Alm *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2006; Tomb *et al.*, 1997). Vergleiche der Genome der Stämme 26695 und

J99 zeigten, dass sich sämtliche orthologen Genpaare der Stämme in ihrer Nukleotid-Sequenz unterscheiden und dass 7% der Gene stammspezifisch sind. Auch weitere Analysen bestätigten das Vorhandensein stammspezifischer Gene (Gressmann *et al.*, 2005; Salama *et al.*, 2000), wobei sich besonders unter den Restriktions-Modifikations-Systemen ein hoher Anteil an spezifischen Genen befindet (Takata *et al.*, 2002). Darüber hinaus zeigte sich, dass sich im Genom viele phasenvariable Gene finden lassen, die durch Leserraster-Verschiebungen innerhalb von Homo- und Dinukleotid-Wiederholungen an- bzw. ausgeschaltet werden können (Alm *et al.*, 1999; Hallet, 2001; Salaun *et al.*, 2004). Besonders Virulenzgene und Gene, die für Oberflächenproteine kodieren, unterliegen dieser Phasenvarianz, so dass es sich wahrscheinlich um einen Mechanismus handelt, der Abwehr des Wirtes durch Diversifikation zu entgehen (Appelmelk *et al.*, 1999; Josenhans *et al.*, 2000; Peck *et al.*, 1999). Eine wichtige Rolle könnte dieser Mechanismus auch in der Kolonisierung spielen, um der Infektabwehr des neuen Wirtes zu entgehen (Falush *et al.*, 2001; Kraft *et al.*, 2006).

1.3.2 Populationsstruktur

Selbst in *H. pylori* lassen sich trotz der hohen Anzahl an Rekombinationsereignissen noch klonale Strukturen erkennen, so dass sich geographisch distinkte Gruppierungen vornehmen lassen (Achtman *et al.*, 1999; Falush *et al.*, 2003). Die hohe Wirtsspezifität von *H. pylori* macht es möglich, die Untersuchung von *H. pylori*-Isolaten als ein Werkzeug in der Populationsgenetik des Menschen zu verwenden. So ließ sich anhand der Sequenz von sieben „Housekeeping“-Genen und einem Virulenzgen von *H. pylori* die Migration des Menschen über die Kontinente erstaunlich genau nachvollziehen (Abbildung 1). Sogar spätere Durchmischungen von Populationen, beispielsweise durch den Sklavenhandel, konnten durch die Analyse der *H. pylori*-Stämme gezeigt werden (Falush *et al.*, 2003; Linz *et al.*, 2007).

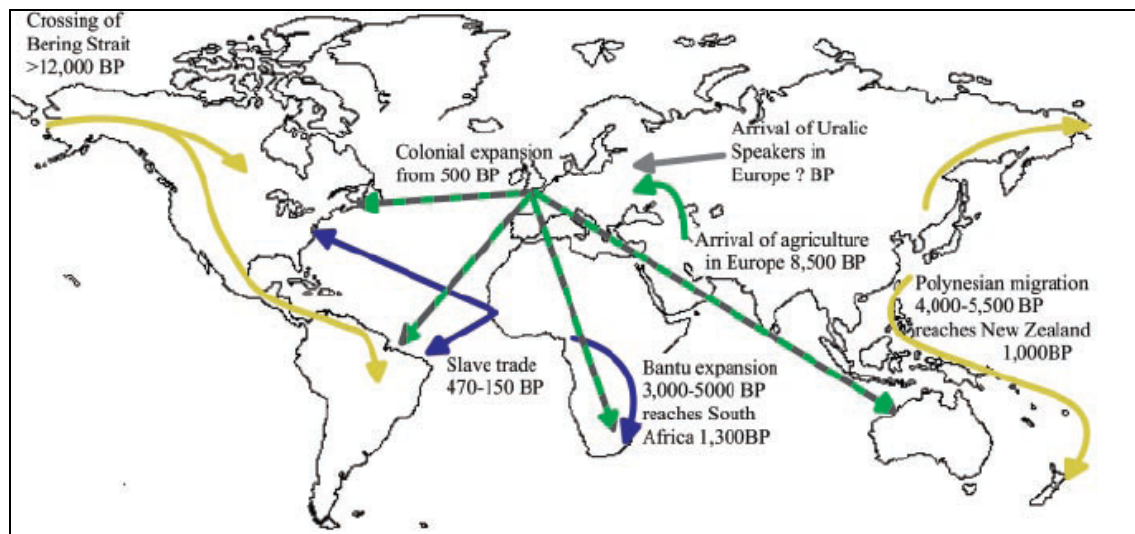


Abbildung 1: Migration von *H. pylori* im Zuge der Völkerwanderungen

Die hohe Wirtsspezifität von *H. pylori* ermöglicht es, durch Vergleiche von Sequenzen verschiedener Isolate unterschiedlicher humaner Populationen, die Völkerwanderungen der Menschheit nachzuvollziehen. Die Pfeile geben die Richtung der Migration an. BP: „vor ... Jahren ausgehend von heute“ (englisch: „years before present“; aus Falush et al., 2003)

1.4 Natürliche Kompetenz, Rekombination und DNA Reparatur in *H. pylori*

1.4.1 Das DNA-Aufnahmesystem ComB

Bei der Ausbildung der genetischen Diversität von *H. pylori* spielt die natürliche Kompetenz des Bakteriums (Nedenskov-Sorensen *et al.*, 1990), also die Fähigkeit, DNA aus seiner Umgebung aufzunehmen und ins Genom zu integrieren, eine wichtige Rolle. Bei den meisten anderen natürlich kompetenten Bakterien existieren innerhalb der DNA Erkennungssequenzen, anhand derer sie DNA der eigenen Art erkennen können, um die Aufnahme und Integration von DNA anderer Arten zu vermeiden (Sisco und Smith, 1979). Im Genom von *H. pylori* konnten solche Erkennungssequenzen nicht gefunden werden (Saunders *et al.*, 1999). Untersuchungen der natürlichen Kompetenz von *H. pylori* ergaben, dass die Kompetenz durch Proteine bestimmt wird, die Homologien zu Proteinen des T4SS von *A. tumefaciens* aufweisen (Hofreuter *et al.*, 1998; Hofreuter *et al.*, 2001; Karnholz *et al.*, 2006; Smeets und Kusters, 2002). Im Gegensatz zu dem T4SS von *A. tumefaciens*, welches DNA in Form des Ti-Plasmids aus der Bakterienzelle in die Zelle der Wirtspflanze injiziert (Christie *et al.*, 2005; Zupan *et al.*, 2000), importiert das System von *H. pylori* freie DNA aus der Umgebung in die Bakterienzelle. Aufgrund der Bedeutung für die Kompetenz des

Bakteriums wurde das System ComB genannt und die am Aufbau des Systems beteiligten Gene mit *comB* bezeichnet (Abbildung 2).

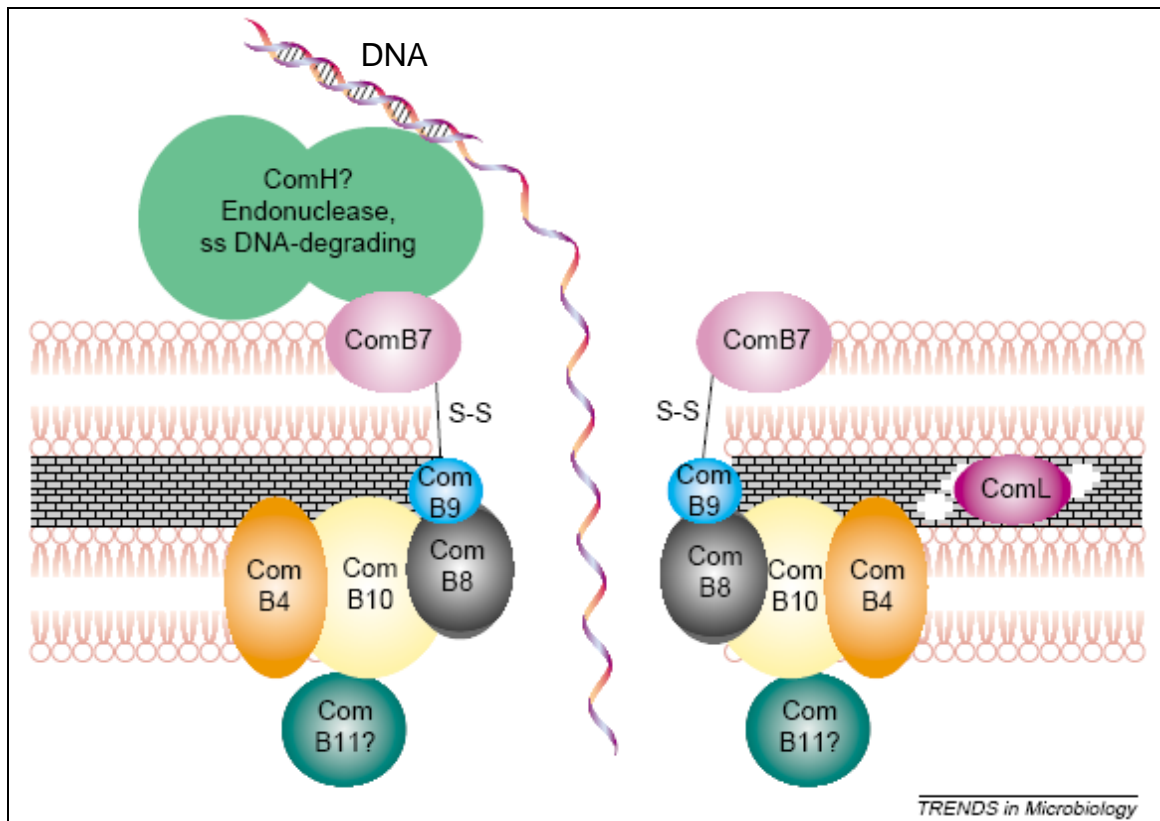


Abbildung 2: Schema des Aufbaus des ComB DNA-Aufnahmesystems von *H. pylori*

In der Abbildung ist eine hypothetische Anordnung der Proteine gezeigt, die am Aufbau des ComB-Systems beteiligt sind. Bei der Aufnahme der DNA wird vermutet, dass doppelsträngige DNA an das System bindet und dann durch eine Exonuklease zu einzelsträngiger DNA degradiert wird. Der DNA-Einzelstrang wird durch die Zellmembran in die Bakterienzelle importiert und steht dort für weitere Prozesse zur Verfügung. (aus Smeets und Kusters, 2002)

Es ist für *H. pylori* noch nicht eindeutig gezeigt, dass die transportierte DNA als Einzelstrang in die Bakterienzelle gelangt, jedoch lassen Untersuchungen an Gram-positiven Bakterienarten wie *S. pneumoniae* und *B. subtilis* (Dubnau, 1999) sowie Beobachtungen in *Haemophilus influenzae* dies mit hoher Wahrscheinlichkeit vermuten (Chen und Dubnau, 2004).

1.4.2 Rekombination

Wenn zwei homologe DNA-Moleküle in einer Zelle vorkommen, kann es zu Rekombination, also dem Austausch von Segmenten der beiden Moleküle, kommen. Rekombination kann spontan zur Durchmischung von genetischen Informationen in einer Population (homologe Rekombination) oder zielgerichtet zur Reparatur von Schäden im Genom auftreten. Der

Austausch von DNA-Segmenten ist an einige Voraussetzungen geknüpft. So müssen die DNA-Moleküle in räumlicher Nähe zueinander liegen, es müssen komplementäre Basenpaarungen stattfinden und es muss eine Verlängerung des Austausches geben. Für diesen komplexen Mechanismus ist eine Vielzahl von Enzymen notwendig (Tabelle 1), die vor allem durch Untersuchungen an *E. coli* aufgeklärt wurden (Kowalczykowski *et al.*, 1994; Kuzminov, 1999).

Tabelle 1: An der Rekombination beteiligte Enzyme von *E. coli* und ihre Funktion

Enzym	Funktion
RecA	Sucht homologe DNA-Bereiche, vermittelt den DNA-Strang-Austausch
RecBCD (Exonuklease V)	DNA-Helikase, ATP-abhängige dsDNA- und ssDNA-Exonuklease
RecBC	DNA-Helikase
RecE (Exonuklease VIII)	dsDNA-Exonuklease, 5' - 3' spezifisch
RecF	bindet ssDNA und dsDNA sowie ATP
RecG	„Branch Migration“ der Holliday-Strukturen, DNA-Helikase
RecJ	ssDNA-Exonuklease, 5' - 3' spezifisch
RecN	unbekannte Funktion, Konsensussequenz für ATP-Bindung
RecO	Interaktion mit RecR und RecF
RecQ	DNA-Helikase
RecR	Interaktion mit RecO und RecF
RecT	DNA-Renaturierung
RuvA	bindet an Holliday-Strukturen; Interaktion mit RuvB
RuvB	„Branch Migration“ der Holliday-Strukturen, DNA-Helikase, Interaktion mit RuvA
RuvC	Endonuklease, Auflösung der Holliday-Strukturen
SbcB (Exonuklease I)	ssDNA-Exonuklease, 3' - 5' spezifisch
SbcCD	ATP-abhängig dsDNA-Exonuklease
SSB	ssDNA-bindendes Protein
DNA-Gyrase	DNA-Gyrase, Typ-II-Topoisomerase
DNA-Ligase	DNA-Ligase
DNA-Polymerase I	DNA-Polymerase, 5' - 3'-Exonuklease, 3' - 5'-Exonuklease
Helikase II	DNA-Helikase
Helikase IV	DNA-Helikase

(nach Kowalczykowski, 1994)

Die zentrale Rolle bei der Initiierung der Rekombination kommt dem RecA-Protein zu (Cox, 2003). RecA bindet als Multimer an freie einzelsträngige DNA (ssDNA) in der Zelle und beginnt nach homologen Bereichen im Chromosom zu suchen. Findet es einen homologen doppelsträngigen DNA-Abschnitt, verdrängt das Enzym einen der Stränge und ermöglicht die

Basenpaarung zwischen den beiden komplementären Einzelsträngen. Dadurch bildet sich eine Kreuzstruktur, die so genannte Holliday-Struktur (Holliday, 1964). Diese wird vom RuvA-Protein wahrgenommen, welches an die Struktur bindet und damit die Anlagerung von RuvB veranlasst. Dieser Komplex verlängert unter ATP-Verbrauch die Heteroduplex-DNA (englisch: „Branch Migration“). Um den Komplex aufzulösen, müssen die einzelnen DNA-Stränge geschnitten werden. Diese Funktion übernimmt das RuvC-Protein (West, 1996). Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten, wo RuvC die DNA-Stränge aufspaltet, so dass unterschiedliche Muster des Heteroduplex-Moleküls möglich sind, die mit den englischen Begriffen „patched“ (geflickt) bzw. „spliced“ (gespleisst) bezeichnet werden (Kowalczykowski, 2000). Anschließend werden vorhandene Lücken durch Neusynthese von DNA durch die Polymerase I und Ligation der Strangenden durch die DNA-Ligase geschlossen (Abbildung 3).

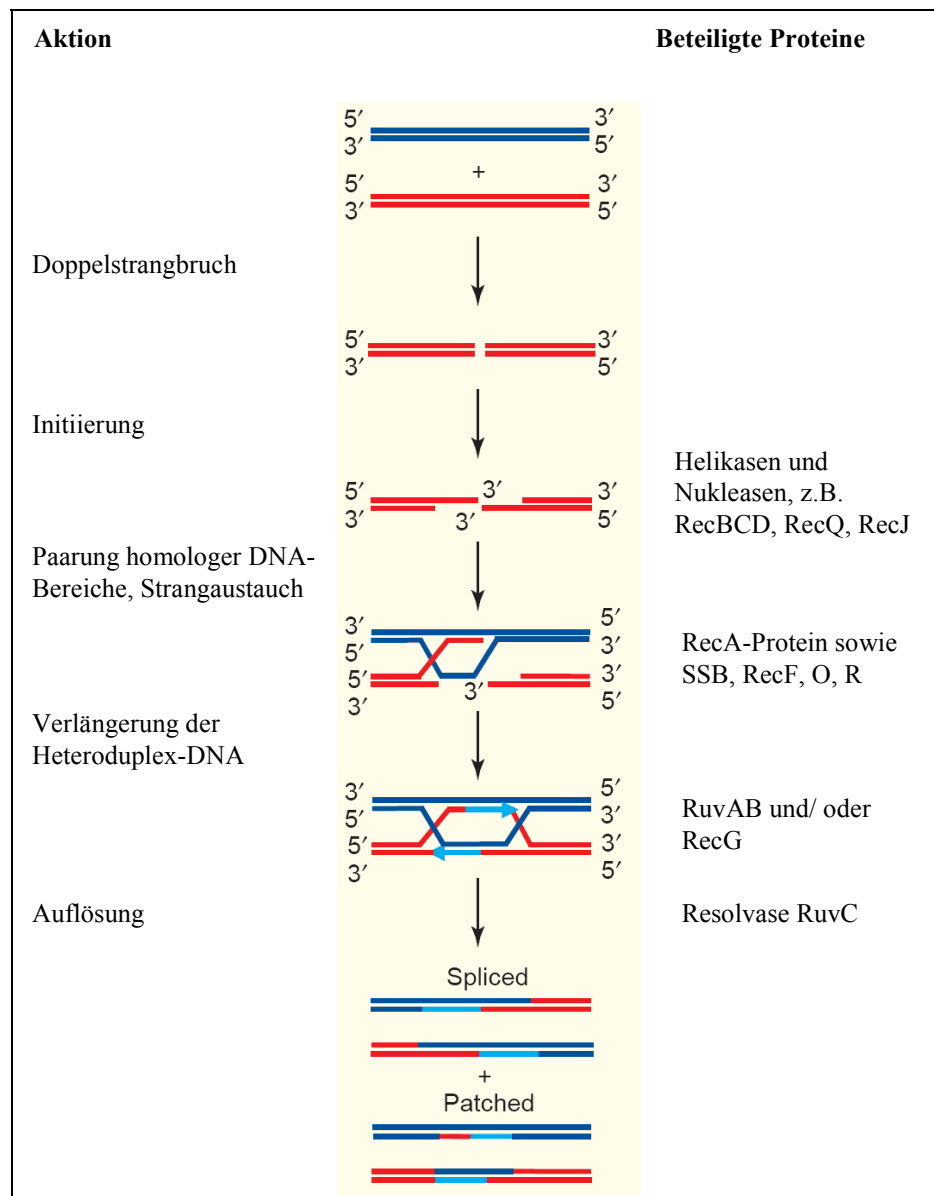


Abbildung 3: Modell des Ablaufs der homologen Rekombination

Das Modell stellt die einzelnen Schritte innerhalb des Prozesses der homologen Rekombination anhand der Reparatur von Doppelstrangbrüchen in der DNA dar (Szostak *et al.*, 1983). Der erste Schritt in diesem Reparatur-Mechanismus ist die Generierung von Einzelstrang-DNA durch Nukleasen und Helikasen am Doppelstrangbruch. Die durch RecA vermittelte Rekombination läuft anschließend wie im Text dieses Abschnitts beschrieben ab. Rot: chromosomale DNA, dunkelblau: lineares DNA-Molekül, hellblau: neu synthetisierte DNA (aus Kowalczykowski, 2000)

Aus den Analysen der beiden zuerst sequenzierten Genome der Stämme 26695 und J99 geht hervor, dass *H. pylori* nicht alle der in Tabelle 1 für *E. coli* aufgeführten Proteine besitzt (Alm *et al.*, 1999; Tomb *et al.*, 1997). Jedoch werden auch in *H. pylori* die Schlüsselenzyme im Prozess der Rekombination exprimiert (Kang und Blaser, 2006a; Kraft und Suerbaum, 2005).

Untersuchungen an *recA*-Mutanten in *H. pylori* zeigten, dass das Protein auch hier eine zentrale Funktion in der Rekombination hat. So waren die Mutanten Rekombinations-negativ

und nicht in der Lage, Schädigungen der DNA durch Rekombination zu reparieren (Schmitt *et al.*, 1995). Weiterhin hatten die Mutanten eine geringere Säuretoleranz und eine reduzierte Resistenz gegen ultraviolette (UV) Strahlung als Wildtyp-Bakterien (Thompson und Blaser, 1995). Fischer und Haas fanden in ihren Experimenten heraus, dass das RecA-Protein aus *H. pylori* postranslational modifiziert wird, wobei die Modifikation keine Rolle in der Rekombination oder Resistenz gegen UV-Strahlung spielt, die Bakterien aber sensibler gegenüber Metronidazol macht (Fischer und Haas, 2004).

Auch Homologe der Gene *ruvA*, *ruvB* und *ruvC* konnten in den *H. pylori*-Genomen gefunden werden, so dass die Prozessierung der Holliday-Strukturen ähnlich wie in *E. coli* ablaufen könnte (Fischer *et al.*, 2001a). Untersuchungen der Resolvase RuvC in *H. pylori* zeigten, dass die Inaktivierung des *ruvC*-Gens im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Stämmen zu einer deutlich niedrigeren Transformationsfrequenz führte und dass die Mutante deutlich sensibler gegen Mitomycin C war (Loughlin *et al.*, 2003). Mitomycin C bewirkt Doppelstrangbrüche in der DNA, welche durch Rekombination repariert werden, so dass eine höhere Sensibilität gegenüber diesem Antibiotikum Einschränkungen in der Rekombination anzeigt. Außerdem waren *ruvC*-Mutanten nicht in der Lage, eine chronische Infektion in einem Mausmodell herbeizuführen (Robinson *et al.*, 2005). Auch *H. pylori ruvB*-Mutanten wiesen einen Rekombinations-negativen und UV-sensitiven Phänotyp auf (Kang und Blaser, 2008).

Neben den zuvor genannten Enzymen sind noch viele andere Proteine wie Nukleasen und Helikasen an der Rekombination beteiligt, die das Entwinden des DNA-Doppelstranges und die Synthese von ssDNA katalysieren.

In *E. coli* sind vier ssDNA-Exonukleasen beschrieben, die unterschiedliche Funktionen aufweisen. Die Exonuklease RecJ degradiert einzelsträngige DNA ausschließlich in 5'-3'-Richtung, die Exonukleasen I und X arbeiten in die entgegen gesetzte Richtung und die Exonuklease VII kann ssDNA sowohl vom 5'- als auch vom 3'-Ende ausgehend abbauen (Dutra *et al.*, 2007; Viswanathan und Lovett, 1998). SsDNA-Exonukleasen sind nicht nur an der Rekombination sondern auch an der methylgerichteten Reparatur von Basenfehlpaarungen beteiligt (Chase und Richardson, 1977; Cooper *et al.*, 1993). In *H. pylori* sind nur Homologe von RecJ und Exonuklease VII zu finden.

Ebenfalls an der Rekombination beteiligt sind die Proteine RecG, RecN und RecR. RecG bewirkt in *E. coli* die Bildung und Migration von Holliday-Strukturen an angehaltenen Replikationsgabeln (Bolt und Lloyd, 2002; McGlynn und Lloyd, 2001). Für *H. pylori* konnte gezeigt werden, dass *recG* eine limitierende Wirkung auf die homologe Rekombination des Bakteriums hat und nicht an der rekombinativen Reparatur der DNA beteiligt ist (Kang *et al.*, 2004). Auch für das Protein RecN wurde eine Beteiligung an der Rekombination in mehreren Bakterienarten wie *B. subtilis*, *E. coli* und *Neisseria gonorrhoeae* nachgewiesen (Alonso *et al.*, 1993; Picksley *et al.*, 1984; Sanchez *et al.*, 2006; Skaar *et al.*, 2002). Die Inaktivierung des *recN*-Gens führte dabei immer zu einer Reduktion der Rekombinationsfrequenzen. Derselbe Effekt wurde auch in *H. pylori*-Mutanten gezeigt (Wang und Maier, 2008b), die zudem auch noch eine verminderte Fähigkeit aufwiesen, den Magen von Mäusen zu kolonisieren. Für das RecR-Protein ist nachgewiesen worden, dass es für die Beladung von ssDNA mit RecA verantwortlich ist, wenn diese vom Einzelstrang-DNA-bindenden Protein (Ssb) geschützt wird (Umezu *et al.*, 1993; Umezu und Kolodner, 1994).

Für andere Proteine, die in *E. coli* an der Rekombination beteiligt sind wie z.B. RecQ und RecF, konnten keine homologen Gene in den *H. pylori*-Genomen nachgewiesen werden (Kang und Blaser, 2006a).

1.4.3 DNA-Reparatursysteme

In der Evolution ist eine gewisse Fehlerrate in der DNA-Replikation von großer Bedeutung, um eine Weiterentwicklung und Anpassung zu ermöglichen. Für das einzelne Individuum aber ist eine starke Akkumulation an Mutationen im Genom letal und die Anzahl an Mutationen in der DNA muss somit gering gehalten werden. Zu diesem Zweck haben sich verschiedene Reparatur-Mechanismen entwickelt, die in fast allen Organismen vorhanden sind. Die Ursachen für Mutationen im Genom sind vielfältig. So können während der Replikation aber auch durch Rekombination nichtkomplementäre Basen eingebaut werden oder Basen durch toxische Agenzien und UV-Strahlung geschädigt werden. Im folgenden Abschnitt sollen die wichtigsten Mechanismen vorgestellt werden, die in der DNA-Reparatur von Bakterien allgemein und speziell von *H. pylori* eine Rolle spielen.

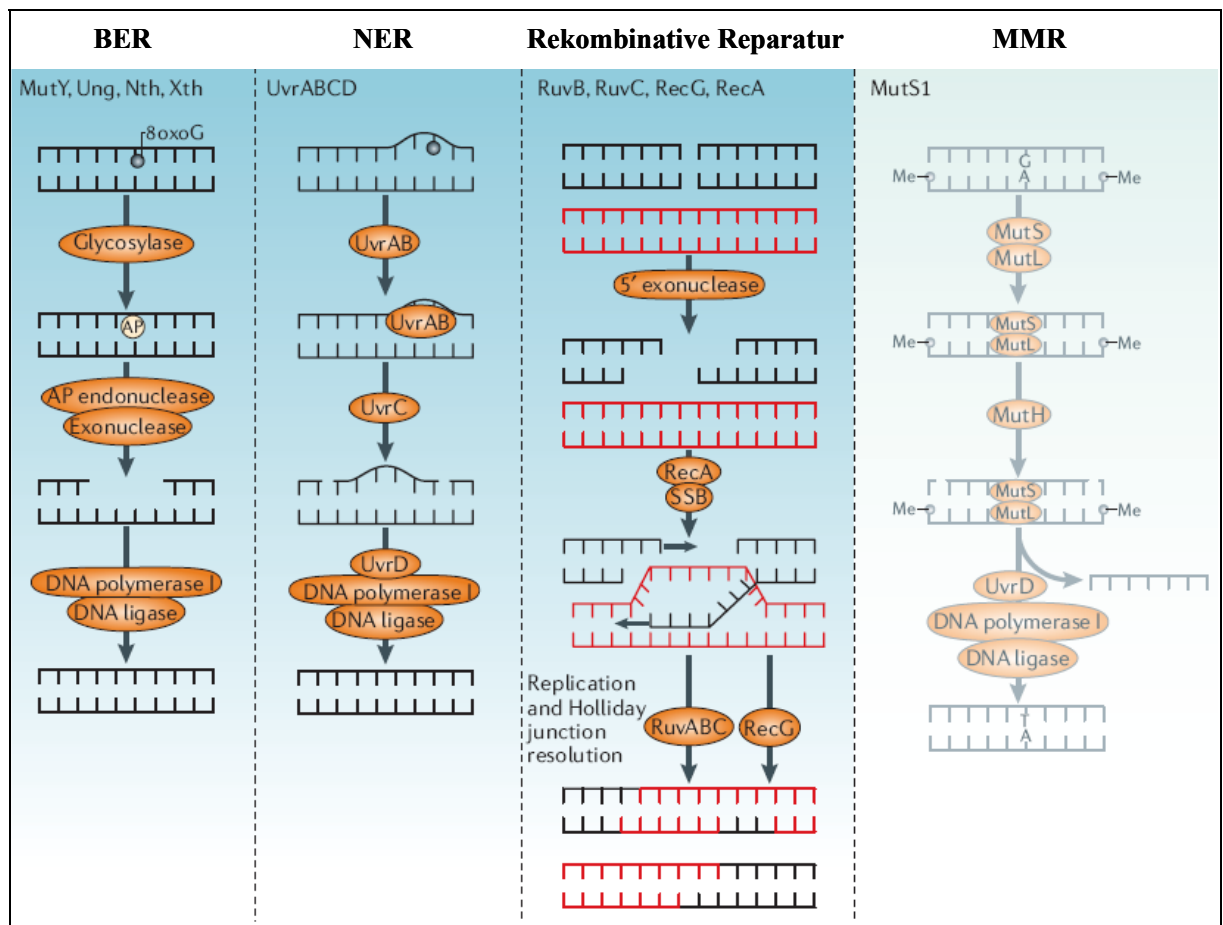


Abbildung 4: Schematische Darstellung der verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen in Bakterien

Zur Reparatur beschädigter DNA haben sich verschieden Mechanismen entwickelt. In der Abbildung sind die Basen-Exzisions-Reparatur (BER), die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER), die rekombinative Reparatur und die in *H. pylori* nicht vorhandene „Mismatch“-Reparatur dargestellt. (aus Kang und Blaser, 2006)

„Mismatch“-Reparatur

Bei den meisten Organismen ist die Reparatur von Fehlpaarungen durch das „Mismatch“-Reparatur-System (MMR, Abbildung 4) ein hoch konservierter Mechanismus (Modrich und Lahue, 1996). Am genauesten wurde dieses System in *E. coli* untersucht. Drei Proteine arbeiten in dem System zusammen: MutS erkennt die Basenfehlpaarung in der DNA und lagert sich an sie an. Dieser Komplex wird von MutL erkannt und das Protein leitet MutH an diese Stelle. MutH besitzt eine Endonuklease-Aktivität und setzt einen Schnitt in einem der DNA-Einzelstränge. Dabei nutzt es bestimmte Sequenzen im Genom mit der Basenabfolge GATC, die eine Methylierung des Adenins aufweisen, als Erkennungsstellen der eigenen DNA, schneidet aber nur an unmethylierten GATC-Stellen (Lahue *et al.*, 1989; Schofield und Hsieh, 2003). Die Methylierung an GATC-Stellen wird während der Synthese eines neuen

DNA-Stranges durch die Dam-Methylase bewirkt. Dabei ist während der Replikation der „alte“ DNA-Strang methyliert, der neu synthetisierte Strang muss dagegen noch methyliert werden. Dieses erlaubt eine Unterscheidung des alten Stranges mit der wahrscheinlich korrekten Nukleotidabfolge vom neu erzeugten Strang mit dem Fehler (Messer und Noyer-Weidner, 1988). Ausgehend von dem erzeugten Schnitt wird dann der Doppelstrang durch die Helikase UvrD getrennt und der geöffnete Einzelstrang von Exonukleasen degradiert. Die erzeugte Lücke im Einzelstrang wird anschließend durch eine Polymerase und der Ligase geschlossen.

In *H. pylori* lassen sich keine homologen Gene zu *mutH* oder *mutL* finden, so dass ein „Mismatch“-Reparatur-System offenbar nicht vorhanden ist (Alm *et al.*, 1999). Lediglich ein *mutS*-Gen existiert; allerdings wurde gezeigt, dass das MutS-Protein von *H. pylori* zur Untergruppe 2 der MutS-Homologe gehört, welche nicht an der Reparatur von Basenfehlpaarungen beteiligt ist (Eisen, 1998; Kang *et al.*, 2005). Die Funktion der *mutS2*-Gruppe liegt in der Rekombination, wo MutS die homologe und homeologe Rekombination limitiert (Pinto *et al.*, 2005). Die Abwesenheit dieses Systems könnte eine Erklärung für die hohe Mutationsrate von *H. pylori* sein.

Nukleotid-Exzisions-Reparatur

Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER, Abbildung 4) wurde durch die Untersuchung UV-sensitiver Bakterienmutanten entdeckt und die Gene aus diesem Grunde *uvr* (UV-Reparatur) genannt, mit den beteiligten Genen *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* und *uvrD* (Hill, 1958; Howard-Flanders *et al.*, 1962; Howard-Flanders und Theriot, 1962). Dieser Reparaturweg erkennt DNA-Schäden wie Pyrimidin-Dimere oder unförmige Basenmodifikationen durch polycyclische Kohlenwasserstoffe und entfernt diese aus dem Chromosom. Der Mechanismus ist in mehrere Phasen unterteilt. Zuerst bilden zwei UvrA-Untereinheiten und eine UvrB-Untereinheit in Gegenwart von ATP einen Komplex, der an die geschädigte DNA bindet. Nach der Bindung wird UvrA durch UvrC ersetzt und das Phosphodiesterband acht Nukleotide in 5'-Richtung und fünf Nukleotide in 3'-Richtung ausgehend vom Schaden hydrolysiert. Die UvrD-Helikase entfernt das heraus geschnittene DNA-Stück und die Lücke wird von Polymerase I und der DNA-Ligase geschlossen (Van Houten, 1990).

Auch in *H. pylori* sind Homologe aller vier *uvr*-Gene zu finden und es wurde gezeigt, dass mindestens *uvrD* zum Schutz gegen durch UV-Licht hervor gerufene DNA-Schäden

notwendig ist. Weiterhin konnte auch eine limitierende Wirkung des UvrD-Proteins auf die Rekombination festgestellt werden. Mutanten, die ein inaktiviertes *uvrD*-Gen trugen, hatten eine 66-fach erhöhte Rekombinationsfrequenz im Vergleich zum Wildtyp-Stamm, wenn sie mit einem PCR-Produkt eines isogenen Rif-resistenten Stammes transformiert wurden (Kang und Blaser, 2006b). Eine Limitierung der Rekombination durch UvrD wurde auch in *E. coli* nachgewiesen, in dessen Genom sich weniger RecA/DNA-Strukturen bildeten, wenn UvrD aktiv war als in der UvrD-negativen Mutante (Centore und Sandler, 2007).

Basen-Exzisions-Reparatur

Ein weiterer DNA-Reparaturmechanismus ist die Basen-Exzisions-Reparatur (BER, Abbildung 4). Im Mittelpunkt dieses Mechanismus stehen Glykosylasen, die die N-glykosidische Bindung zwischen der beschädigten Base und der Desoxyribose hydrolysieren, so dass eine Apyrimidin- oder Apurin-Stelle (AP) entsteht. Diese wird durch eine AP-Endonuklease erkannt, die auf der 5'-Seite der AP-Stelle das Desoxyribosephosphat-Band schneidet. Dadurch entsteht ein freier Desoxyribosephosphat-Rest, welcher durch die Desoxyribosephosphat-Diesterase entfernt wird. Die so entstandene Lücke wird durch eine DNA-Polymerase und der DNA-Ligase geschlossen (David und Williams, 1998; Demple und Harrison, 1994). In *H. pylori* existieren vier Glykosylasen mit verschiedenen Spezifitäten, MagIII, MutY, Nth und Ung (Huang *et al.*, 2006; O'Rourke *et al.*, 2000; O'Rourke *et al.*, 2003). Ung erkennt Uracil in der DNA, welches durch die Deaminierung von Cytosin-Resten entsteht, MagIII entfernt methylierte Adenin-Reste aus der DNA und Nth schneidet beschädigte Pyrimidine aus der DNA (Bjelland *et al.*, 1993; David und Williams, 1998; Krokan *et al.*, 1997; O'Rourke *et al.*, 2000; O'Rourke *et al.*, 2003). MutY schließlich erkennt Fehlpaarungen zwischen Adenin und 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-OxoG), welches durch die Oxidation von Guanin entsteht und während der Replikation zum Einbau eines Adenins anstelle eines Cytosins führen kann. Dadurch kommt es zu einer Transversion von C:G zu A:T im Genom. Im Gegensatz zu den anderen Glykosylasen, welche die geschädigte Base entfernen, löst MutY das falsch eingebaute Adenin aus der DNA. MutY kann außerdem auch A-und-G- sowie A-und-C-Fehlpaarungen reparieren (Au *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 2003; Tsai-Wu *et al.*, 1992). Die Inaktivierung von MutY führt zu einer Erhöhung der Mutationsfrequenz und in *E. coli* zu einem starken Anstieg an C-zu-A-Transversionen im Genom (Eutsey *et al.*, 2007; Garibyan *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006; Kulick *et al.*, 2008b; Mathieu *et al.*, 2006). In *H. pylori* existieren zwei Endonukleasen, die an der Reparatur von AP-Stellen beteiligt sein

könnten, *nucT* und *xth* (Huang *et al.*, 2006; Mathieu *et al.*, 2006). Für NucT wurde dabei eine Beteiligung an der Transformation und eine Membran-Assoziation festgestellt (O'Rourke *et al.*, 2004), so dass diese Endonuklease in der Reparatur von AP-Stellen eher keine Rolle spielt. Die Inaktivierung des *xth*-Gens führte in *H. pylori* zu einem leichten Anstieg der Mutationsrate. Durch *in vitro*-Experimente mit Gesamtzellextrakten konnte aufgeklärt werden, dass AP-Stellen durch die Xth-Endonuklease entfernt werden (Huang *et al.*, 2006; Mathieu *et al.*, 2006; O'Rourke *et al.*, 2003).

Rekombinative Reparatur

Einzel- und doppelsträngige DNA-Brüche im Genom können zum Abbruch der Replikation führen und sind somit letal, wenn sie nicht behoben werden. In *E. coli* werden solche Schädigungen der DNA durch rekombinative Reparatur behoben (Abbildung 4). Der RecBCD-Weg leitet dabei die Reparatur von Doppelstrangbrüchen ein, während der RecFOR-Weg Einzelstrangbrüche beseitigt (Dillingham und Kowalczykowski, 2008; Kuzminov, 1999). Nach der Initiation der Reparatur läuft die Rekombination wie in Abschnitt 1.4.2 beschrieben ab. Trotz seiner hohen Rekombinationsrate fehlen *H. pylori* wichtige Gene dieser beiden Reparaturmechanismen (Kang und Blaser, 2006a; Tomb *et al.*, 1997). So lassen sich im Genom des Bakteriums weder RecC- und RecD- noch RecF-kodierende Gene identifizieren. Allerdings wurden kürzlich Homologe zu *recB* und *recO* gefunden und ihre Beteiligung an der homologen Rekombination gezeigt (Amundsen *et al.*, 2008; Marsin *et al.*, 2008).

1.5 Zielsetzung

Eine Besonderheit von *Helicobacter pylori* ist die hohe genetische Variabilität des Bakteriums. Diese resultiert aus der Kombination einer erhöhten Mutationsrate und einer hohen Rekombinationsfrequenz, die zu einem häufigen DNA-Austausch verschiedener Stämme in Patienten mit Mehrfachinfektionen führt. Die dadurch hervorgerufene Vielfalt des Bakteriums geht soweit, dass nahezu jedes infizierte Individuum einen oder mehrere einzigartige Stämme aufweist. Innerhalb einer Untersuchung von klinischen Isolaten aus Patienten, die mit mehreren *H. pylori* Stämmen infiziert waren, konnte gezeigt werden, dass ins Genom importierte DNA-Fragmente mit 417 Bp ausgesprochen kurz waren im Vergleich zu DNA-Importen in anderen Bakterien (für *E. coli* wurden beispielsweise Importlängen von >10.000 Bp ermittelt). Bisher konnte noch nicht gezeigt werden, welche Mechanismen für die hohe Rekombinationsrate und den gleichzeitigen Import nur kurzer DNA-Fragmente in das Genom des Bakteriums verantwortlich sind.

In *E. coli* wurde in mehreren Untersuchungen gezeigt, dass MutY eine wichtige Rolle in der Reparatur durch reaktive Sauerstoffspezies hervorgerufener Mutationen spielt. Dabei erkennt das Enzym Fehlpaarungen zwischen dem Oxidationsprodukt von Guanin, 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-OxoG), und Adenin und entfernt den Adeninrest. Die dadurch entstehende apurinische Stelle wird durch weitere Prozesse repariert, so dass am Ende wieder eine korrekte G:C-Paarung entsteht. Außerdem wurde in *E. coli* gezeigt, dass die Inaktivierung des *mutY*-Gens zu einem Anstieg an Transversionen im Genom führt. Die Untersuchungen von *mutY*-Mutanten in *H. pylori* sollen zeigen, ob die Inaktivierung des Gens ebenfalls eine Auswirkung auf die Häufigkeit und Art der Mutationen im *rpoB*-Gen hat und ob sich der Wegfall der MutY-Glykosylase auf die Fitness des Bakteriums auswirkt. Rif-Resistenz wird durch verschiedenartige Punktmutationen an etwa zehn verschiedenen Stellen im *rpoB*-Gen hervorgerufen. Dadurch ist es möglich mit Hilfe der Sequenzierung eines 731 Bp langen Abschnitts des Gens, in welchem die meisten der bekannten Rifampicin (Rif)-Resistenz vermittelnden Mutationen lokalisiert sind, einen möglichen Effekt von MutY auf die Art der Mutation zu analysieren. Darüber hinaus soll die Fitness der *mutY*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp durch die Kultivierung beider Stämme zusammen in einer Flüssigkultur und nachfolgender Ermittlung der Anzahl von Bakterien eines jeden Stammes bestimmt werden.

Neben Untersuchungen der Mutation sollte in dieser Arbeit der genetische Austausch zwischen verschiedenen *H. pylori*-Stämmen näher untersucht werden, der für die Entstehung der genetischen Variabilität des Bakteriums *Helicobacter pylori* mitverantwortlich ist. Dazu wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Suerbaum ein *in vitro*-Transformationssystem entwickelt, in dem der zu untersuchende *H. pylori*-Stamm (Rezipient) mit genomischer DNA eines Rif-resistenten *H. pylori*-Stammes (Donor) inkubiert und anschließend mittels Selektion auf Rif-Resistenz auf Rekombinationsereignisse untersucht wird. Rifampicin-Resistenz wird durch bestimmte Punktmutationen im für die DNA-abhängige RNA-Polymerase kodierenden Gen *rpoB* hervorgerufen, so dass auch spontane Resistenzen auftreten können. Durch die Ermittlung der Anzahl Rif-resistenter Klone ohne die Zugabe von DNA sowie nach der Inkubation mit Donor-DNA lassen sich sowohl Aussagen über die Mutationsfrequenz als auch über die Frequenz durch Rekombination hervorgerufener Rif-Resistenzen treffen. Weiterhin kann mit Hilfe dieses Modells die Länge der importierten DNA ermittelt werden. Dazu wird ein 1663 Bp langes Fragment des *rpoB*-Gens Rif-resistenter Klone sequenziert und anschließend mit den Sequenzen des Rezipienten- und Donor-Stammes verglichen. Die Sequenzunterschiede zwischen zwei Stämmen in dem untersuchten Bereich liegen bei ~5%, so dass sich relativ gleichmäßig über das Genfragment verteilt bis zu 92 Polymorphismen befinden, die eine genaue Bestimmung von Rekombinationsstart- und -endpunkten zulassen.

Um genauere Schlüsse über die DNA-Reparatur, Rekombination und die Länge der DNA-Importe in *Helicobacter pylori* treffen zu können, sollen innerhalb dieser Arbeit gezielt Gene des DNA-Aufnahmesystems sowie Gene der DNA-Reparatur- und Rekombinationssysteme des Bakteriums mittels gerichteter Mutagenese inaktiviert werden. Die *H. pylori*-Wildtypstämme 26695, J99 und N6 sowie die erzeugten Mutanten-Stämme sollen mit Hilfe des *in vitro*-Transformationssystems untersucht werden.

Ein erster Kontakt zwischen der freien DNA in der Umgebung und *H. pylori* wird durch das DNA-Aufnahmesystem ComB hergestellt. Anschließend wird die DNA mit Hilfe dieses Systems in die Zellen importiert. Durch die Inaktivierung des Gens *comB10* soll der Aufnahmemechanismus des Bakteriums ausgeschaltet werden. Anschließend soll die DNA durch Elektroporation in die *comB10*-Mutante gebracht werden. Die Untersuchung der Sequenz Rif-resistenter Klone nach der Elektroporation soll zeigen, ob die Länge der integrierten DNA-Fragmente durch die Passage des ComB-Systems beeinflusst wird. Außerdem sollen *recA*-Mutanten im Transformationsmodell untersucht werden. Das Protein

RecA hat eine zentrale Aufgabe im Prozess der Rekombination und DNA-Reparatur. In Untersuchungen anderer Gruppen wurde bereits für *H. pylori* gezeigt, dass Mutantenstämme ohne RecA nicht oder nur begrenzt in der Lage sind fremde DNA in ihr Genom zu integrieren. Weitere Gene für die aufgrund von Untersuchungen in *E. coli* und anderen Bakterien ein Effekt auf die DNA-Reparatur, Rekombination und vor allem die Länge der DNA-Importe postuliert werden kann und welche in dieser Arbeit näher betrachtet werden sollen, sind die Helikasen *recB*, *recG*, *recN* und *recR*, die Glykosylasen *mutY*, *nth* und *ung*, die Endonuklease *xth* sowie die Exonukleasen *recJ* und *xseA*.

2 Material

2.1 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Geräteliste

Gerät	Typ, Hersteller
Anaerobier-Töpfe	Oxoid (Wesel)
Brutschränke	Scholzen® Brutschrank, Microbiology Systems AG (Wittenbach, Schweiz) KB 500, Heraeus (Hanau)
Elektroporationsgerät	Gene Pulser XCell, Bio-Rad (München)
Gelelektrophoresekammern	Bio-Rad (München)
Heizblöcke	Eppendorf (Hamburg)
Mikroskop	BX40, Olympus (Hamburg)
pH-Meter	pH-Meter 761 (Jürgens)
Reinraumwerkbänke	Kojair® (Tampere, Finnland)
Rotationsschüttler	Hartenstein GmbH (Würzburg)
Schüttelinkubator	Hartenstein GmbH (Würzburg)
Sequenzierer	3130xl-Kapillarsequenzierer, Applied Biosystems (Foster City, USA)
Spannungsgeräte	Bio-Rad (München)
Speed Vac	SC110A (Savant, USA)
Spektralphotometer	GeneQuant pro, Amersham Biosciences (Freiburg).
„Thermocycler“	T3, Biometra (Göttingen) PTC-200, MJ Research (Waltham, USA)
UV-Transilluminator	Bio-Rad (München)
Schüttler	IKA® Vortex (Wilmington, USA)
Waage	Feinwaage, Sartorius AG (Göttingen)
Zentrifugen	Biofuge Pico, Heraeus (Hanau) 1-15 K, Sigma (Steinheim) 4K15, Sigma (Steinheim)

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien waren vom höchsten käuflichen Reinheitsgrad und wurden soweit nicht anders vermerkt von den folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), JT Baker (Deventer, Niederlande) Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim) und Sarstedt (Nümbrecht). Die Chemikalien wurden

abhängig von der Anwendung entweder in bidestilliertem Wasser oder HPLC-gereinigtem Wasser (JT Baker) gelöst.

2.3 Bakterienstämme

2.3.1 *Helicobacter pylori*-Stämme

In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten *H. pylori*-Stämme aufgelistet. Dabei handelt es sich sowohl um *H. pylori* Wildtyp-Stämme als auch um im Zuge dieser Arbeit hergestellte *H. pylori*-Mutanten.

Tabelle 3: *H. pylori*-Wildtyp-Stämme und *H. pylori*-Mutanten

Stamm	Genotyp	Referenz
26695	Wildtyp	(Tomb <i>et al.</i> , 1997)
Ala15	Wildtyp	(Achtman <i>et al.</i> , 1999)
J99	Wildtyp	(Alm <i>et al.</i> , 1999)
SA166A	Wildtyp	(Achtman <i>et al.</i> , 1999)
N6	Wildtyp	(Ferrero <i>et al.</i> , 1992)
26695-R1	Isogene Rif ^r 26695-Mutante; T zu C Mutation an Position 1757 im <i>rpoB</i> -Gen	(Kraft, 2004)
J99-R3	Isogene Rif ^r J99-Mutante; A zu T Mutation an Position 1618 im <i>rpoB</i> -Gen	(Kraft, 2004)
N6-R1	Isogene Rif ^r N6-Mutante; C zu T Mutation an Position 1589 im <i>rpoB</i> -Gen	(Kraft, 2004)
26695comB10	HP0042 inaktiviert durch die Unterbrechung mit <i>aphA3'</i> -III, Km ^r	Diese Arbeit
26695mutY	HP0142 inaktiviert durch die Unterbrechung mit <i>aphA3'</i> -III, Km ^r	(Kulick <i>et al.</i> , 2008b)
J99mutY	JHP0130 inaktiviert durch die Unterbrechung mit <i>aphA3'</i> -III, Km ^r	Diese Arbeit
N6mutY	<i>mutY</i> -Homolog inaktiviert durch die Unterbrechung mit <i>aphA3'</i> -III, Km ^r	Diese Arbeit
26695mutY comp	Chromosomal komplementierte 26695 <i>mutY</i> -Mutante; zur Komplementierung wurde das Plasmid pADC-HpmutY verwendet, Km ^r , Cm ^r	Diese Arbeit
26695nth	HP0585 inaktiviert durch die Unterbrechung mit <i>cat</i> , Cm ^r	Diese Arbeit
26695recB	HP1553 inaktiviert durch die Unterbrechung mit <i>cat</i> , Cm ^r	Diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
26695 <i>recA</i>	HP0153 inaktiviert durch die Unterbrechung mit <i>aphA3'</i> -III, Km ^r	Diese Arbeit
26695 <i>recG</i>	HP1523 inaktiviert durch die Unterbrechung mit <i>cat</i> , Cm ^r	Diese Arbeit
26695 <i>recJ</i>	HP0348 inaktiviert durch die Unterbrechung mit <i>aphA3'</i> -III, Km ^r	Diese Arbeit
26695 <i>recJxseA</i>	HP0348 inaktiviert durch die Unterbrechung mit <i>aphA3'</i> -III und HP0259 inaktiviert durch die Unterbrechung mit <i>cat</i> , Km ^r , Cm ^r .	Diese Arbeit
26695 <i>recN</i>	HP1393 inaktiviert durch die Unterbrechung mit <i>cat</i> , Cm ^r	Diese Arbeit
26695 <i>recR</i>	HP0925 inaktiviert durch die Unterbrechung mit <i>cat</i> , Cm ^r	Diese Arbeit
26695 <i>ung</i>	HP1347 inaktiviert durch die Unterbrechung mit <i>cat</i> , Cm ^r	Diese Arbeit
26695 <i>xseA</i>	JHP0243 inaktiviert durch die Unterbrechung mit <i>cat</i> , Cm ^r	Diese Arbeit
26695 <i>xth</i>	HP1526 inaktiviert durch die Unterbrechung mit <i>aphA3'</i> -III, Km ^r	Diese Arbeit

aphA3'-III: Aminoglykosid-Phosphotransferase, *cat*: Chloramphenicol-Acetyltransferase, Cm^r: Chloramphenicol-resistent, Km^r: Kanamycin-resistent, Rif^r: Rifampicin-resistent

2.3.2 *Escherichia coli*-Stämme

Tabelle 4 listet die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme auf.

Tabelle 4: *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α	F ⁻ , φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	(Hanahan, 1983)
MC1065	<i>E. coli</i> K-12 <i>leuB6</i> Δ(<i>lacJPOZY</i>)X74 <i>trpC9830 strA</i>	(Casadaban und Cohen, 1980)

2.4 Plasmide

In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet.

Tabelle 5: Plasmide

Plasmid	Genotyp	Referenz
pBHpC8	Quelle der <i>cat</i> -Kassette, Cm ^r	(Ge <i>et al.</i> , 1995)
pILL600	Quelle der <i>aphA3'-III</i> -Kassette, Km ^r	(Labigne-Roussel <i>et al.</i> , 1988)
pUC18	<i>lacZ</i> , <i>bla</i> , Amp ^r , <i>E. coli</i> -Vektor mit hoher Kopienzahl	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pSUS2500	<i>mutY</i> aus <i>H. pylori</i> 26695 über PstI in pUC18 kloniert, Amp ^r	(Kulick <i>et al.</i> , 2008b)
pSUS2501	<i>comB10</i> aus <i>H. pylori</i> 26695 über PstI in pUC18 kloniert, Amp ^r	Diese Arbeit
pSUS2502	<i>recJ</i> aus <i>H. pylori</i> 26695 über PstI in pUC18 kloniert, Amp ^r	Diese Arbeit

Plasmid	Genotyp	Referenz
pSUS2503	<i>recA</i> aus <i>H. pylori</i> 26695 über BamHI in pUC18 kloniert, Amp ^r	Diese Arbeit
pSUS2508	<i>aphA3</i> '-III über BamHI/BglII in Produkt der inversen PCR von pSUS2500 kloniert, Amp ^r , Km ^r	(Kulick <i>et al.</i> , 2008b)
pSUS2510	<i>aphA3</i> '-III über BamHI/BglII in Produkt der inversen PCR von pSUS2502 kloniert, Amp ^r , Km ^r	Diese Arbeit
pSUS2511	<i>aphA3</i> '-III über BamHI/BglII in Produkt der inversen PCR von pSUS2503 kloniert, Amp ^r , Km ^r	Diese Arbeit
pSUS2513	<i>aphA3</i> '-III über BamHI/BglII in Produkt der inversen PCR von pSUS2501 kloniert, Amp ^r , Km ^r	Diese Arbeit
pSUS2518	<i>xth</i> aus <i>H. pylori</i> 26695 über PstI in pUC18 kloniert, Amp ^r	Diese Arbeit
pSUS2520	<i>aphA3</i> '-III über BamHI/BglII in Produkt der inversen PCR von pSUS2518 kloniert, Amp ^r , Km ^r	Diese Arbeit
pSUS2524	<i>xseA</i> aus <i>H. pylori</i> 26695 über PstI in pUC18 kloniert, Amp ^r	Diese Arbeit
pSUS2525	<i>cat</i> über BamHI/BglII in Produkt der inversen PCR von pSUS2524 kloniert, Amp ^r , Cm ^r	Diese Arbeit
pSUS2526	<i>recR</i> aus <i>H. pylori</i> 26695 über PstI in pUC18 kloniert, Amp ^r	Diese Arbeit
pSUS2527	<i>recN</i> aus <i>H. pylori</i> 26695 über PstI in pUC18 kloniert, Amp ^r	Diese Arbeit
pSUS2528	<i>recG</i> aus <i>H. pylori</i> 26695 über PstI in pUC18 kloniert, Amp ^r	Diese Arbeit
pSUS2529	<i>recB</i> aus <i>H. pylori</i> 26695 über PstI in pUC18 kloniert, Amp ^r	Diese Arbeit
pSUS2530	<i>cat</i> über BamHI/BglII in Produkt der inversen PCR von pSUS2526 kloniert, Amp ^r , Cm ^r	Diese Arbeit
pSUS2532	<i>cat</i> über BamHI/BglII in Produkt der inversen PCR von pSUS2527 kloniert, Amp ^r , Cm ^r	Diese Arbeit
pSUS2534	<i>cat</i> über BamHI/BglII in Produkt der inversen PCR von pSUS2528 kloniert, Amp ^r , Cm ^r	Diese Arbeit
pSUS2535	<i>cat</i> über BamHI/BclI in Produkt der inversen PCR von pSUS2529 kloniert, Amp ^r , Cm ^r	Diese Arbeit
pSUS2537	<i>nth</i> aus <i>H. pylori</i> 26695 über PstI in pUC18 kloniert, Amp ^r	Diese Arbeit
pSUS2538	<i>ung</i> aus <i>H. pylori</i> 26695 über PstI in pUC18 kloniert, Amp ^r	Diese Arbeit
pSUS2540	<i>cat</i> über BamHI/BglII in Produkt der inversen PCR von pSUS2537 kloniert, Amp ^r , Cm ^r	Diese Arbeit
pSUS2541	<i>cat</i> über BamHI/BglII in Produkt der inversen PCR von pSUS2538 kloniert, Amp ^r , Cm ^r	Diese Arbeit
pADC-HpMutY	<i>ureAB</i> -Fragment in pUC18 mit <i>H. pylori</i> <i>mutY</i> und <i>cat</i> zwischen <i>ureA</i> -Promotor und <i>ureA</i> -Gen, Amp ^r , Cm ^r	(Huang <i>et al.</i> , 2006)
Amp ^r : Ampecillin-resistent, <i>aphA3</i> '-III: Aminoglykosid-Phosphotransferase Acetyltransferase, Cm ^r : Chloramphenicol-resistent, Km ^r : Kanamycin-resistent		

2.5 Oligonukleotid-Primer

Die Synthese der Oligonukleotid-Primer (Primer) und der Sonde HPmutY-LVsd wurde von der MWG-Biotech AG (Ebersberg) durchgeführt. Die Primer wurden im lyophilisierten Zustand geliefert und vor Benutzung in HPLC-gereinigtem Wasser gelöst, so dass die Konzentration der Lösung 200 µM betrug. Die Primer wurden bei -20°C gelagert (Tabelle 6).

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Primer

Primer	Zielgen	Primersequenz (5' → 3')	RS	Referenz
C05	<i>16S</i>	ACTTCACCCCAGTCGCTG		(Ge <i>et al.</i> , 1995)
C97	<i>rDNA</i>	GCTATGACGGGTATCC		
HPcomb10-1s	<i>comB10</i>	gcgctgcagGTGAATAAGTGGATTAAAGG	PstI	Diese Arbeit
HPcomb10-2s		gcgctgcagCGATGACTTCATTCTCTCTG	PstI	
HPcomb10-3s		ataagatctCTGTAATGGTGCGTAAAAGC	BglII	
HPcomb10-4s		ttaagatctGATTACGCCCATTTCTAGCC	BglII	
HPmutY-1	<i>mutY</i>	gcgctgcagTTTGGGCAAGATGATAAGCC	PstI	(Kulick <i>et al.</i> , 2008b)
HPmutY-2		gcgctgcagGTGGTTGTAGTTGGAACTTTAC	PstI	
HPmutY-3		ataagatctAAGCTTTAATGATAACCAAGCC	BglII	
HPmutY-4		aatagatctAAGATTGAGAAAGTCATTCGC	BglII	
HPmutY1979		GTGGTTGTAGYTGGAACTTTACAC		(Achtman <i>et al.</i> , 1999)
HPmutY1980		CAACGCCCAAGTAACGCTCTTC		
HPmutY-LCfw		CTGCTCCCCTAAACCCAAAT		Diese Arbeit
HPmutY-LCrv		GGATCACAACGCCCAAGTAA		Diese Arbeit
HPmutY-LVsd		FAM-AAAACAAGAAATCATTCAAGAAGAGCG-Dabcyl		Diese Arbeit
HPnth-1PstI	<i>nth</i>	gcgctgcagCGTGAATGTCAAAGGCACAC	PstI	Diese Arbeit
HPnth-2PstI		gcgctgcagAAAGTATCCACGCTCTCTCC	PstI	
HPnth-3BglII		ttaagatctGAGGGCTAAATCGTTTCACGC	BglII	
HPnth-4BglII		ttaagatctATGTGGTGCTTTCAGTGTGC	BglII	
HP1553-1PstI	<i>recB</i>	gcgctgcagGAATTTGACGCTGTCTTTGC	PstI	Diese Arbeit
HP1553-2PstI		gcgctgcagTCTTAAGCGTCAAAGTCTGAGC	PstI	
HP1553-3BclI		atagcgtgatcaAATGATTAAAGGCGCACTGC	BclI	
HP1553-4BclI		atagcgtgatcaTTTATGCGCCACTAATGACG	BclI	
HPrecA-1s	<i>recA</i>	ataggatccGGCAATAGATGAAGACAAAC	BamHI	Diese Arbeit
HPrecA-2s		aatggatccACTCCATTTCTTCTAAAGGC	BamHI	
HPrecA-3s		ataagatctCGTCATGCCAATCTTCATTC	BglII	
HPrecA-4s		ttaagatctGGAGTCCAGAGACTACAAC	BglII	
HP1523-1PstI	<i>recG</i>	gcgctgcagAGGCTCGTCTTTGCATGC	PstI	Diese Arbeit

Primer	Zielgen	Primersequenz (5' → 3')	RS	Referenz
HP1523-2PstI		gcgctgcagTTAAATTACCCAATTCTGCC	PstI	
HP1523-3BglII		ataagatctTTAAGGCTTCGTTATAAAGC	BglII	
HP1523-4BglII		ataagatctAGCGTTGTTGTTTGATAAGC	BglII	
HPrecJ-1s		gcgctgcagAAGAGCGCATGGCTTCTATC	PstI	
HPrecJ-2s	<i>recJ</i>	gcgctgcagACACTCATCTAATTCCACGC	PstI	Diese Arbeit
HPrecJ-3s		ataagatctCCCTGCGGACTTGATTAAGG	BglII	
HPrecJ-4s		ttaagatctATGCAAGATGCGAAAAATGGC	BglII	
HP1393-1PstI		gcgctgcagATGAAGACGCTCTTGTGGTC	PstI	
HP1393-2PstI	<i>recN</i>	gcgctgcagATATAAGGTGCGCTCAAATCTAC	PstI	Diese Arbeit
HP1393-3BglII		ataagatctCGCTCTCTAAAGCATGCGTG	BglII	
HP1393-4BglII		ataagatctTTGGCATGCTAAGTGGGATC	BglII	
HP0925-1PstI		gcgctgcagTTTGTGGCCCTCCATTTTC	PstI	
HP0925-2PstI	<i>recR</i>	gcgctgcagAATTAGGCATTCCAAACTGC	PstI	Diese Arbeit
HP0925-3BglII		ataagatctTTGTCTGGCTTTCATCAGAGC	BglII	
HP0925-4BglII		ataagatctCCCACCTTAGCTAATGATTC	BglII	
HPung-1PstI		gcgctgcagGGCATGCCTTAACGGATACC	PstI	
HPung-2PstI	<i>ung</i>	gcgctgcagAAATGCCCATGCACGCTGTC	PstI	Diese Arbeit
HPung-3BglII		ttaagatctGCCACCGGCAATTCTTGATC	BglII	
HPung-4BglII		ttaagatctCTTGTTGTGGGGATTTGAGC	BglII	
HPxseA-1s		gcgctgcagATGCATGTATTGAGCGTGAGC	PstI	
HPxseA-2s	<i>xseA</i>	gcgctgcagCTACACCCTATCCACGCTC	PstI	Diese Arbeit
HPxseA-3s		ataagatctTGATGCAAACCAATTCGCAC	BglII	
HPxseA-4s		ttaagatctTTCAAAGCGTGGTGGAGAGC	BglII	
HP1526-1s		gcgctgcagCAACGAAGTTTAAGATGGTGG	PstI	
HP1526-2s	<i>xth</i>	gcgctgcagGCAGCATTCAAGGGTTTTTCG	PstI	Diese Arbeit
HP1526-3s		ataagatctAAAACGACTCAAATTCGCAAG	BglII	
HP1526-4s		ttaagatctCTATCCAGGCTTAGTTATCG	BglII	
Km1	<i>aphA3'</i> -	CTGCTAAGGTATATAAGCTGGTGCG		(Suerbaum <i>et al.</i> , 1993)
Km2	III	CATACTGTTCTTCCCCGATATCCTC		
pcat-1	<i>cat</i> -	AACAGCTATGACCATGATTACG		(Ge <i>et al.</i> , 1995)
pcat-2	Kassette	agaggatccGATATCGCATGCCTGCAGAG	BamHI	
HPrpoB-1	<i>rpoB</i>	CCCAACAGATTTAGAAGT		
HPrpoB-3		ATGTGCCTGATTACATCACGAC		
HPrpoB-4		TTGGCGCTGCATGTTAGTCC		
HPrpoB-5		GGTAGCCGCATCGCTCATTC		Diese Arbeit
HPrpoB-6		TTCCCTAACGCTAACTCGC		
HPrpoB-9w		AGACGCYAATCARAGAATGG		
HPrpoB-10		CATCAATCTTGCCCTGATTG		

Primer	Zielgen	Primersequenz (5' → 3')	RS	Referenz
HPrhoB-IscrX		CCTTTGAGTGAAGTTCCGTA		Diese Arbeit

Die in Großbuchstaben geschriebenen Nukleotide sind komplementär zur DNA-Matrize. Nukleotide in Kleinbuchstaben stellen neu in das PCR-Fragment eingebrachte Nukleotide dar, die Restriktionsschnittstellen (RS) kodieren. FAM: Fluorescein

3 Methoden

3.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

3.1.1 Anzucht und Kultivierung von *H. pylori*

Festmedium

Die Anzucht aus Einfrierkulturen und Kultivierung von *H. pylori* erfolgte auf Blutagarplatten (Columbia-Agar-Basis II, Oxoid, Wesel), die mit 10% Pferdeblut (Oxoid) sowie den Antibiotika Vancomycin (10 mg/l), Polymyxin B (2500 U/l), Amphotericin B (4 mg/l) und Trimethoprim (5 mg/l) versetzt wurden. Die Platten wurden in mikroaerober Atmosphäre (5% O₂, 10% CO₂ und 85% N₂) bei 37°C für 24-48 h inkubiert. Zur Selektion und Kultivierung von Mutanten wurde dem Blutagar je nach Resistenz der Mutante Kanamycin (20 µg/ml), Chloramphenicol (20 µg/ml) oder beides zugefügt. Selektion und Kultivierung Rif-resistenter Stämme erfolgte durch das Ausplattieren auf Blutplatten, die mit 10 µg/ml Rifampicin (Rif) versetzt waren.

Flüssigmedium

Die Kultivierung von *H. pylori* in Flüssigmedium wurde in BHI-Medium (englisch: „brain heart infusion“, Oxoid) mit Hefeextrakt (2,5 g/l) durchgeführt, welches 10% hitzeinaktiviertes Pferdeserum (Oxoid) und die schon für Blutagar verwendeten Antibiotika beinhaltet (das Medium wird ab hier als BHI bezeichnet). Flüssigkulturen wurden in Anaerobier-Töpfen (Oxoid) bei 37°C inkubiert. Die mikroaerobe Atmosphäre in den Töpfen wurde durch Zugabe eines AnaerocultC®-Beutels (Merck, Darmstadt) hergestellt. Zur Durchmischung der Kulturen wurden diese bei 175 rpm geschüttelt.

Überprüfung der Reinheit der Kulturen

Die Überprüfung der *H. pylori*-Kulturen erfolgte sowohl mikroskopisch als auch mit Tests der Urease-, Katalase- und Oxidase-Aktivität. Zur Überprüfung der Urease-Aktivität wurde Bakterienmaterial mit einer sterilen Impföse von Blutagarplatten abgenommen und in eine pH-Indikatorlösung (0,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 0,6 mM Di-Natriumhydrogenphosphat, 0,1% Neutralrot, 0,1% Bromthymolblau, 2% Harnstoff, 0,2% Agar No. 1 (Oxoid)) eingerieben. Durch die Urease wird eine Erhöhung des pH-Wertes hervorgerufen, wodurch sich die Lösung blau färbt. Das Vorhandensein der Katalase wurde

durch Auftropfen einer 3%igen H₂O₂-Lösung auf etwas Bakterienmaterial getestet. Die Überprüfung der Oxidase-Aktivität erfolgte mit „Microbiology Bactident® Oxidase“ Teststäbchen (Merck) nach Protokoll des Herstellers.

3.1.2 Anzucht und Kultivierung von E. coli

Zur Anzucht von *E. coli* wurde LB-Agar (Lennox L Broth, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet. Für die Selektion rekombinanter Klone wurden je nach Resistenzmarker der Bakterien Ampicillin (200 µg/ml), Chloramphenicol (20 µg/ml) und/oder Kanamycin (20 µg/ml) verwendet. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert. Zum Nachweis der Alpha-Komplementation („Blau-Weiß-Selektion“) wurden dem LB-Agar Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG, 0,2 mM, Sigma-Aldrich, Steinheim) und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid (X-Gal, 1,6 mg/l, Sigma-Aldrich) zugegeben. *E. coli*-Flüssigkulturen wurden in LB-Medium bei 37°C und 175 rpm inkubiert.

3.1.3 Lagerung von Bakterien

Die Lagerung von Bakterien erfolgte bei -80°C, kurzfristig auch bei -20°C in Kryoröhrchen (Greiner bio-one).

H. pylori

Zur Einlagerung wurden die Bakterien für 48 h inkubiert und anschließend mit einem sterilen Wattetupfer von den Platten abgenommen. Das Bakterienmaterial einer Platte wurde in je 0,8 ml Einfriermedium (BHI, 10% Glycerin) mit und ohne hitzeinaktiviertes Pferdeserum (10%) eingerieben und anschließend bei -80°C gelagert.

E. coli

Die Bakterien wurden in 30 ml LB-Medium für 12-16 h bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (3000 × g, 4°C, 15 min) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Bakterien in 3 ml LB-Medium mit Glycerin (Einlagerung bei 80°C: 20% Glycerin, Einlagerung bei 20°C: 44% Glycerin) aufgenommen. Je 1 ml der Bakterien-Suspension wurde in Kryoröhrchen gegeben und anschließend bei -20°C bzw. -80°C eingefroren.

3.2 DNA-Arbeitstechniken

Für alle DNA-Arbeiten wurden autoklavierte bzw. steril filtrierte (Stericup®; Millipore, Bedford, USA, Porengröße: 0,22 µm) Lösungen und Verbrauchsmaterialien verwendet.

3.2.1 Isolierung von DNA aus Bakterien

Isolierung der Gesamt-DNA aus *H. pylori*

Kleinere Mengen DNA wurden mit Hilfe des „QIAamp DNA Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) gewonnen. Dazu wurde mit einer sterilen Impföse etwas Bakterienmaterial von einer Platte abgenommen und in 180 µl ATL-Puffer (Qiagen) suspendiert. Anschließend wurden zu der Suspension 20 µl Proteinase K (Qiagen) gegeben. Die weiteren Schritte erfolgten nach Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde mit zweimal 100 µl AE-Puffer (Qiagen) eluiert und bei -20°C gelagert.

Größere Mengen (>50 µg) an hochmolekularer DNA wurden mittels „Genomic-tip 100/G“-Säulen und des „Genomic DNA Buffer Set“ (Qiagen) isoliert. Drei Blutagarplatten mit *H. pylori* wurden für 24-48 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mit einem sterilen Wattetupfer abgenommen und in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung eingerieben. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (5000 × g, 4°C, 15 min) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und die DNA nach Protokoll des Herstellers isoliert. Die DNA wurde in 200-300 µl H₂O aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Überprüfung von Plasmiden wurden diese aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse extrahiert (Birnboim und Doly, 1979). Dazu wurden 5 ml LB-Selektivmedium mit einer Einzelkolonie beimpft und für 12-16 h inkubiert (37°C, 175 rpm). Von der Kultur wurden 1,5 ml abgenommen, die Bakterien durch Zentrifugation (3000 × g, 4°C, 10 min) sedimentiert und die Plasmid-DNA wie von Sambrook und Russell beschrieben isoliert (Sambrook und Russell, 2004). Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 30 µl Tris-HCl (10 mM) mit RNase A (10 µg/ml, Qiagen) aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Plasmid-Lösung bei -20°C gelagert.

Ebenfalls wurde das „QIAprep® Kit“ (Qiagen) zur Isolierung von Plasmid-DNA genutzt. Dazu wurden 2 ml der Bakterienkultur abgenommen und zentrifugiert (3000 × g, 4°C,

10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit den Bakterien zur Isolierung des Plasmids nach Protokoll des Herstellers verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl EB-Puffer (Qiagen) eluiert.

Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden 30 ml LB-Selektivmedium mit einer Einzelkolonie beimpft und für 12-16 h inkubiert (37°C, 175 rpm). Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert (3000 × g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment über Tip-100-Säulen (Qiagen) und die vom Hersteller empfohlenen Puffer nach Protokoll aufgereinigt. Die Plasmid-DNA wurde in 300 µl EB-Puffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.2.2 Quantifizierung und Qualitätskontrolle von DNA

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}) und Berechnung nach folgender Formel bestimmt:

Formel 1

$$c [\mu\text{g/ml}] = 50 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor.}$$

Die Reinheit der DNA wurde ebenfalls photometrisch durch Berechnung des Verhältnisses der Absorptionswerte A_{260} zu A_{280} überprüft. Dabei sollte eine reine DNA-Lösung einen Quotienten zwischen 1,7 und 1,9 besitzen. Die Qualität der DNA wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (siehe Abschnitt 3.2.6).

3.2.3 Standard-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Als Matrize für die Standard-PCR wurde entweder genomische DNA oder Plasmid-DNA (10-100 ng pro Reaktion) verwendet. Die PCR wurden in einem finalen Volumen von 50 µl durchgeführt. Zur Amplifikation wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Reagenzien eingesetzt. Die PCR wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Für die Elongation des Fragments wurden 60 Sekunden pro 1000 Bp Länge veranschlagt. Zur Vervielfältigung der DNA wurde das in Tabelle 8 dargestellte Temperaturprofil verwendet.

Das Produkt wurde anschließend in einer Agarose-Gelelektrophorese auf die richtige Größe überprüft (siehe Abschnitt 3.2.6) und bei -20°C gelagert.

Tabelle 7: Standardreaktionsansatz einer PCR

Reagenz	Pro Reaktion [µl]	Hersteller
10× Reaction Buffer	5,0	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
MgCl ₂ (25 mM)	3,0	Amersham Pharmacia Biotech
dNTP (200 µM)	8,0	Amersham Pharmacia Biotech
Primer 1 (20µM)	0,5	MWG Biotech AG
Primer 2 (20µM)	0,5	MWG Biotech AG
Taq-Polymerase (1u/ml)	0,2	Amersham Pharmacia Biotech
Matrizen-DNA	5,0	
Wasser ad 50 µl	27,8	JT Baker

Tabelle 8: Temperaturprofil einer Standard-PCR

Aktion	Temperatur [°C]	Zeit
Initiale Denaturierung	94	5 Minuten
Vermehrungszyklen (30)		
Denaturierung	94	60 Sekunden
Anlagerung der Primer	T _A der spezifischen Primer	60 Sekunden
Elongation durch Taq-Polymerase	72	produktspezifisch

3.2.4 PCR-Synthese fehlerarmer Produkte

Die Taq-Polymerase hat eine Fehlerrate von etwa 10^{-6} . Um PCR-Produkte mit einer geringeren Fehlerhäufigkeit zu bekommen, wurde das „Expand High Fidelity PCR System“ (Roche, Mannheim) verwendet. Dieses PCR-System beinhaltet neben der Taq-Polymerase zusätzlich noch die Tgo-Polymerase, welche eine 3′-5′-Exonuklease-Aktivität besitzt, die die Fehlerrate senkt. Die PCR wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.6). Zur Lagerung wurden die PCR-Produkte bei -20°C eingefroren.

3.2.5 Spezifische PCR zum Auffinden bestimmter Spontanmutationen im *rpoB*-Gen

Eine PCR erlangt ihre Spezifität über die Sequenz der eingesetzten Primer. Durch ein besonderes Design eines Primers ist es sogar möglich bestimmte Allele eines Gens durch den

Nachweis von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, englisch: „single nucleotide polymorphism“) zu finden (Abbildung 5) (Furuta *et al.*, 2007).

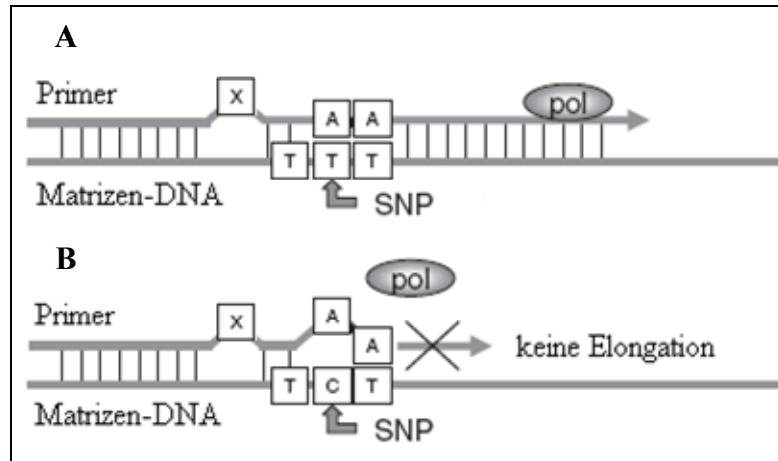


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines allelspezifischen Primers

Die Spezifität eines Primers für einen bestimmten SNP wird dadurch erreicht, dass vom 3'-Ende des Primers ausgerechnet das fünfte Nukleotid nicht an den Strang bindet (X) und das zweite Nukleotid auf den SNP liegt. Der Primer bindet an die Matrize, wenn das Nukleotid komplementär zum SNP ist (A). Dadurch kann sich die Polymerase (pol) anlagern und die PCR ablaufen. Ist das zweite Nukleotid nicht komplementär, kann kein PCR-Produkt gebildet werden (B). (modifiziert nach Furuta *et al.* 2007)

Eine solche hoch spezifische PCR wurde in dieser Arbeit verwendet, um 26695 *mutY*-Klone nach Durchführung eines Transformationsexperiments (siehe Abschnitt 3.5) mit J99-R3 Donor-DNA auf DNA-Importe zu durchsuchen. Dieses war notwendig, da die hohe Mutationsfrequenz der Mutante es schwierig machte, Klone mit DNA-Import im hohen Hintergrund an Klonen mit einer Rif-Resistenz vermittelnden Spontanmutation zu finden. Für die PCR wurden die Primer HPrpoB-IscrX und HPrpoB-4 benutzt. HPrpoB-IscrX ist dabei spezifisch für die Rif-Resistenz vermittelnde Punktmutation des *H. pylori*-Stammes J99-R3, also einen Thymin an Position 1618 im *rpoB*-Gen. Die PCR wurde bei einer Anlagerungstemperatur von 50°C durchgeführt und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. PCR-positive Klone wurden anschließend wie in Abschnitt 3.7 beschrieben sequenziert.

3.2.6 Analyse und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosekonzentration der in dieser Arbeit angefertigten Gele für die Auftrennung von DNA-Fragmenten lag zwischen 0,7% und 2%. Die Agarose (SeaKem®LE Agarose, Cambrex Bio Sciences, Verviers, Belgien) wurde durch Aufkochen in 1 × Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer; pH = 8) gelöst und nach Abkühlen auf 50-60°C in einen Gel-Träger gegossen.

5 µl der DNA-Proben (bzw. 1,5 µl bei genomischer DNA) wurden mit 1 µl Ladepuffer (0,075% (v/v) Bromphenolblau, 0,06 M EDTA, 59% (v/v) Glycerin, 0,1% (v/v) SDS, pH = 8) gemischt und in die Kavitäten des Gels gefüllt. Als Längenmarker wurde der „1 kb Plus DNA Ladder“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die DNA wurde bei einer Spannung von 70-130 V für 50-90 Minuten aufgetrennt. Um die DNA in dem Agarosegel sichtbar zu machen, wurden die Gele für 20 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 mg/l, Roth, Karlsruhe) sowie für 10 Minuten in einem Wasserbad inkubiert. Während der Inkubation interkaliert das Ethidiumbromid mit dsDNA, so dass sie anschließend in einem UV-Transilluminator unter Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 300 nm sichtbar gemacht und fotografiert werden konnte.

Ebenfalls wurde die Agarose-Gelelektrophorese zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten verwendet. Dazu wurde die Probe wie zuvor beschrieben aufgetrennt, in einer Ethidiumbromid-Lösung inkubiert und anschließend das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem „QIAquick® DNA Purification Kit“ (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt und mit 30 µl H₂O eluiert.

Säulenaufreinigung von Nukleinsäuren

Bevor PCR-Produkte und Restriktionsansätze weiter verwendet werden konnten (z.B. für Sequenzierungen oder Klonierungen), mussten diese von Nukleotiden, Salzen und Enzymen befreit werden. Dazu wurden sie mit Hilfe des „QIAquick® Purification Kit“ nach Protokoll des Herstellers aufgearbeitet und mit 30-50 µl H₂O eluiert.

3.2.7 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung von DNA wurde die Didesoxy- oder Kettenabbruch-Methode nach Sanger verwendet (Sanger *et al.*, 1977).

In dieser Arbeit wurde für die Kettenabbruchreaktion das „BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1“ (SeqMix, Applied Biosystems, Foster City, USA), nach dem in Tabelle 9 dargestellten Schema, verwendet. Die Reaktion erfolgte in 0,2 ml Reaktionsgefäßen mit dem in Tabelle 10 angegebenen Temperaturprofil.

Die Reaktionsansätze wurden anschließend mit „Centri-Sep Spin Columns“ (Applied Biosystems) nach den Angaben des Herstellers oder über „Sephadex™ G-50 Fine DNA

Grade“ (Amersham Bioscience Biotech, Freiburg) aufgereinigt. Das Sephadex wurde dazu mit einem „Multi Screen Column Loader“ (für 45 µl Kavitäten, Millipore, Badford, USA) in „Multi Screen HV 96 Well“ Filtrationsplatten (Porengröße 0,45 µm, Millipore) gefüllt und mit 300 µl H₂O (JT Baker) pro Kavität überschichtet. Die Platten wurden über Nacht (ÜN) bei 4°C inkubiert und anschließend nach Angaben des Herstellers gewaschen. Die Proben wurden mit H₂O verdünnt (1:2) und je 10 µl pro Kavität aufgetragen. Durch Zentrifugation wurden die Proben eluiert (900 × g, RT, 3 min) und anschließend mit H₂O verdünnt (1:6). 30 µl der Proben wurden dann im „ABI 3130xl Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems) aufgetrennt und analysiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm „BioNumerics V4.5“ (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) ausgewertet.

Tabelle 9: Standardreaktionsansatz einer Sequenzierreaktion

Reagenz	Pro Reaktion	Hersteller
5 × Reaction Buffer	2,5 µl	Applied Biosystems
SeqMix	1 µl	Applied Biosystems
Primer (20µM)	0,5 µl	MWG Biotech AG
DNA-Matrize	50-200 ng	
Wasser	ad 10 µl	JT Baker

Tabelle 10: Temperaturprofil der Kettenabbruchreaktion

Aktion	Temperatur [°C]	Zeit
Initiale Denaturierung	96	1 Minuten
Vermehrungszyklen (25)		
Denaturierung	96	10 Sekunden
Anlagerung der Primer	51	5 Sekunden
Elongation durch die Polymerase	60	4 Minuten

3.3 RNA-Arbeitstechniken

Um eine enzymatische Hydrolyse der RNA durch RNasen zu vermeiden, wurden, soweit nicht anders angegeben, alle Arbeiten auf Eis durchgeführt. Zudem wurden RNase-freie Filterspitzen und Reaktionsgefäße genutzt. Für die Herstellung von Puffern wurde HPLC-gereinigtes Wasser verwendet, welches zuvor mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, 0,1%, v/v)

behandelt (37°C, ÜN) und autoklaviert wurde. Alle Lösungen und Gebrauchsmaterialien, die nicht schon RNase-frei waren, wurden vor Gebrauch zweimal autoklaviert.

3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *H. pylori*

Für die Isolierung von RNA aus *H. pylori* wurden 24 h alte Bakterien von Blutagarplatten abgenommen, in BHI eingerieben und die Suspension genutzt, um eine 10 ml-Vorkultur mit einer Bakteriendichte von $2,1 \times 10^7$ Bakterien/ml anzupflanzen. Die Bakterienzahl wurde photometrisch über die Messung der optischen Bakteriendichte bei 600 nm (OD_{600}) berechnet. Dabei hat eine Suspension der *H. pylori*-Stämme 26695, J99 und N6 bei einer optischen Dichte vom $OD_{600} = 1$ etwa 3×10^8 Bakterien/ml (Kulick *et al.*, 2008b). Die Vorkultur wurde für ca. 20 h inkubiert (37°C, 175 rpm) und anschließend genutzt um die eigentlichen Kulturen (10 ml) mit einer Bakterienzahl von ca. $1,5 \times 10^7$ Bakterien/ml zu beimpfen. Die Kulturen wurden für etwa 14-16 h inkubiert, bis etwa eine $OD_{600} = 1$ erreicht war. Je 2 ml der Kulturen wurden in entsprechende Reaktionsgefäße gefüllt, die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert ($13000 \times g$, 4°C, 1 min) und der Überstand verworfen. Die Reaktionsgefäße mit dem Bakteriensediment wurden sofort in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Um die Bakterien aufzuschließen, wurden die Bakteriensedimente in 850 µl RLT-Puffer (Qiagen), der mit β-Mercaptoethanol (10 µl/ml) versetzt war, aufgenommen und nach Durchmischung in „Lysing Matrix B“-Röhrchen (Qbiogene, Carlsbad, USA) überführt. Der Aufschluss erfolgte im „Bead-Beater FP120“ (Savant, New York, USA) für 45 Sekunden bei einer Stärke von 6,5. Danach wurde die Suspension zentrifugiert, um die Glaskugeln der „Lysing Matrix B“ zu sedimentieren ($13000 \times g$, 4°C, 2 min). Der RNA-haltige Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 500 µl 96%igen Ethanol gemischt. Die weitere Isolierung erfolgte mit Hilfe des „RNeasy Kit“ (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers. Die RNA wurde mit zweimal 44 µl H₂O (RNase-frei, Qiagen) eluiert. Die noch in der Lösung vorhandene DNA wurde durch einstündige Inkubation mit DNase I (20 U, Roche) und dem entsprechenden Reaktionspuffer (Roche) verdaut. Die erfolgreiche Entfernung der DNA wurde mittels einer PCR mit den Primern HPrpoB-3 und HPrpoB-4 sowie 1 µl der RNA-Lösung kontrolliert. Bei negativer PCR wurde die RNA ein weiteres Mal mit dem „RNeasy Kit“ nach Hersteller-Protokoll aufgereinigt und mit zweimal 30 µl H₂O eluiert. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt und nach folgender Formel berechnet:

Formel 2

$$c [\mu\text{g/ml}] = 40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor.}$$

Bei reiner RNA sollte das Verhältnis der Absorptionswerte A_{260} zu A_{280} zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Zudem wurde die Qualität der RNA durch Gelelektrophorese in einem MOPS-Agarosegel (0,8% Agarose, 20mM Morpholinopropansulfonsäure, 10mM Na-Acetat, 1mM EDTA, pH = 7) überprüft. Die RNA-Lösung wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.2 Reverse Transkription von RNA

Zur weiteren Analyse der RNA wurde diese zuvor genutzt um cDNA zu erzeugen. Dazu wurden 2 µg RNA mit zufällig bindenden „Random Hexamer Primern“ (Invitrogen) gemischt und anschließend durch die „Superscript III Reverse Transcriptase“ (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben (Tabelle 11). Der Reaktionsansatz wurde mit 30 µl H₂O (Qiagen) aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

Tabelle 11: Durchführung der reversen Transkription

Reagenz	Pro Reaktion	Hersteller
Gesamt-RNA	2 µg	
Random Primer (110ng/µl)	3 µl	Invitrogen
H ₂ O, RNase-frei	11 µl	Qiagen
Inkubation: 10 min, 65°C		
Inkubation: 10 min, RT		
5x RT-Puffer	4 µl	Invitrogen
DTT (0,1M)	2 µl	Invitrogen
dNTP (10mM)	1 µl	Amersham Pharmacia Biotech
RnaseOut	1 µl	Invitrogen
Superscript III™ (200U)	1 µl	Invitrogen
Inkubation: 2 h, 42°C		
Inkubation: 15 min, 70°C		

3.3.3 Semiquantitative Amplifikation von cDNA

Die semiquantitative Amplifikation von cDNA wurde genutzt, um Unterschiede in der Expression des *mutY*-Gens zu untersuchen. Dazu wurde eine PCR mit einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt (Tabelle 12). Die PCR wurde mit den Primern HPmutY1979 und

HPmutY1980 bei einer Anlagerungstemperatur von 55°C über 25 Zyklen amplifiziert. Die Länge des erwarteten Produktes betrug 704 Bp. Die Produkte der semiquantitativen PCR wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Zur Kontrolle der Einheitlichkeit der eingesetzten cDNA-Konzentrationen wurde ein Fragment der *16S rRNA* mit den Primern C05 und C97 amplifiziert ($T_A = 55^\circ\text{C}$, 25 Zyklen).

Tabelle 12: Reaktionsansatz einer semiquantitativen PCR

Reagenz	Pro Reaktion [µl]	Hersteller
10× Reaction Buffer	2,5	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	Amersham Pharmacia Biotech
dNTP (200 µM)	4,0	Amersham Pharmacia Biotech
Primer 1 (20µM)	0,25	MWG Biotech AG
Primer 2 (20µM)	0,25	MWG Biotech AG
Taq-Polymerase (1u/ml)	0,1	Amersham Pharmacia Biotech
Matrizen-DNA	2,5	
Wasser ad 25 µl	13,9	JT Baker

3.3.4 Quantitative Amplifikation von cDNA mittels „Real-Time“-PCR

Da mit der semiquantitativen PCR nur eine ungefähre Abschätzung der Genexpression möglich war, wurde für die genaue Quantifizierung der Expression des *mutY*-Gens eine „Real-Time“-PCR entwickelt. Dazu wurden die Primer HPmutY-LCfw und HPmutY-LCrv sowie die Fam-markierte Sonde HPmutY-LCsd konstruiert (Livak *et al.*, 1995), die ein 134 Bp großes Fragment des *mutY*-Gens umschließen. Die „Real-Time“-PCR wurde im „Light Cycler V1.5“ (Roche) amplifiziert. Als Quantifizierungsstandard wurden vier Verdünnungen des Plasmids pADC-HpmutY verwendet. Der Reaktionsansatz und das Temperaturprofil sind Tabelle 13 und Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 13: Reaktionsansatz der *mutY* „Real-Time“-PCR

Reagenz	Pro Reaktion [µl]	Hersteller
10 x ThermoStartBuffer	2,00	ABgene, Hamburg
MgSO ₄ (50 mM)	1,80	ABgene
dNTP's (5 mM)	1,00	Amersham Pharmacia Biotech
BSA (20 mg/ml)	0,70	Roche
HPmutY-LCfw (10 mM)	0,75	MWG
HPmutY-LCsd (10 mM)	1,00	MWG
HPmutY-LC (10 mM)	2,00	MWG
ThermoStartPol (5 U/ml)	0,20	ABgene
Taq-Polymerase (5 U/ml)	0,10	Amersham Pharmacia Biotech
cDNA	5,00	
Wasser ad 20 µl	5,35	Qiagen

Tabelle 14: Temperaturprofil der quantitativen „Real-Time“-PCR

Aktion	Temperatur [°C]	Zeit
Initiale Denaturierung	94	5 Minuten
Vermehrungszyklen (45)		
Denaturierung	94	1 Sekunde
Anlagerung der Primer	55	15 Sekunden
Elongation durch die Polymerase	72	15 Sekunden
Abkühlung der Proben	40	30 Sekunden

3.4 Inaktivierung von Genen in *H. pylori*

Zur Inaktivierung von Genen in *H. pylori* macht man sich die natürliche Kompetenz des Bakteriums zu nutze. Dabei transformiert man *H. pylori* mit einem Plasmid, welches in *E. coli* konstruiert wurde und das durch eine Resistenzkassette inaktivierte Gen beinhaltet. Das Plasmid kann von *H. pylori* nicht vervielfältigt werden, so dass nach selektiver Anzucht nur Klone überleben können, die das unterbrochene Gen in ihr Genom integriert haben. Die einzelnen Schritte dieser Methode sind in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben.

3.4.1 Klonierung eines *H. pylori*-Gens

Für die Klonierung des gewünschten *H. pylori*-Gens wurde dieses zuerst durch eine PCR mit spezifischen Primern amplifiziert. Durch die Primer wurde eine Restriktionsschnittstelle (BamHI oder PstI) in das PCR-Produkt eingebracht, über die das Fragment in die „Multiple Cloning Site“ des *E. coli*-Vektors pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) ligiert werden konnte. Das PCR-Produkt wurde wie in Abschnitt 3.2.6 beschrieben aufgereinigt und anschließend wie auch der Vektor mit dem passenden Restriktionsenzym verdaut. Dazu wurde der Restriktionsansatz (Tabelle 15) für 2-3 h mit der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert (siehe Herstellerangaben). Im nächsten Schritt wurde der linearisierte Vektor dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu vermeiden. Der Ansatz (Tabelle 16) wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend auf 85°C erhitzt um die „calf intestine alkaline phosphatase“ (CIAP, Amersham Pharmacia Biotech) zu inaktivieren.

Für die Ligation des präparierten PCR-Produktes in den linearisierten Vektor wurde das „Quick Ligation Kit“ (New England Biolabs, Beverly, USA) verwendet. Die Ligation wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt und das Ligationsprodukt sofort in kompetente *E. coli* transformiert.

Tabelle 15: Standard-Restriktionsansatz

Reagenz	Pro Reaktion [µl]	Hersteller
Puffer des Enzyms	4,0	New England Biolabs
Enzym	1,4	New England Biolabs
DNA	10,0	
Wasser ad 40 µl	24,6	JT Baker

Tabelle 16: Reaktionsansatz zur Dephosphorylierung von DNA-Enden

Reagenz	Pro Reaktion [µl]	Hersteller
10 × OPA	40	Amersham Pharmacia Biotech
CIAP 1:20 verdünnt in 1× OPA	1,0	Amersham Pharmacia Biotech
Restriktionsansatz	2,0	
Wasser ad 50 µl	7,0	JT Baker

OPA, englisch: „One-Phor-All-Buffer“

3.4.2 Transformation kompetent gemachter *E. coli*-Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit der Methode nach Hanahan hergestellt (Hanahan, 1983). Dazu wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie der *E. coli*-Stämme DH5 α oder MC1061 beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von dieser Kultur wurde ein Milliliter abgenommen, um eine 100 ml Kultur anzupfen. Diese wurde bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 inkubiert und dann in zwei 50 ml Zentrifugengefäße aufgeteilt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen in einer Zentrifuge sedimentiert (3500 \times g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 10 ml TFB I-Lösung (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂ \times 4H₂O, 30 mM K-Acetat, 10 mM CaCl₂, 15% (v/v)Glyzerin, pH = 5,8, mit Essigsäure einstellen) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Nach erneuter Sedimentation der Bakterien wurden diese in 1,5 ml TFB II-Lösung (10 mM MOPS, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glyzerin, pH = 7) aufgenommen und erneut für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Diese Suspension wurde in 150 μ l Portionen aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

Zu den auf Eis aufgetauten, kompetenten Zellen wurden 5 μ l eines Ligationsansatzes (siehe Abschnitt 3.4.1) gegeben, vorsichtig gemischt und die Suspension für eine Stunde auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen für eine Minute bei 42°C inkubiert, für fünf Minuten auf Eis gestellt, mit 500 μ l SOC-Medium (20 g Bacto Trypton, 5 g Bacto Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 0,186 g KCl, 2,4 g MgSO₄ (wasserfrei), 1 M Glukose, H₂O ad 1 l) überschichtet und bei 37°C mit 700 rpm für eine Stunde geschüttelt. Jeweils 150 μ l und 500 μ l der Bakteriensuspensionen wurden auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden selektiven Zusätzen (siehe Abschnitt 3.1.2) ausplattiert und über Nacht bebrütet (37°C).

Selektions-positive Kolonien wurden zum animpfen von 5 ml Flüssigkulturen genommen und die Plasmide, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, isoliert. Die Richtigkeit der Plasmide wurde über Restriktionsanalysen und PCR kontrolliert.

Von Klonen, die das gesuchte Plasmid enthielten, wurden Einfrierkulturen (siehe Abschnitt 3.1.3) sowie Plasmid-Isolierungen im großen Maßstab (siehe Abschnitt 3.2.1) gemacht.

3.4.3 Inverse PCR zur Einbringung von Restriktionsschnittstellen

Bevor das *H. pylori*-Gen durch das Einfügen einer Resistenzkassette unterbrochen werden konnte, mussten Restriktionsschnittstellen eingefügt werden, die die Klonierung der Kassette in die gewünschte Position ermöglichten. Dazu wurde eine inverse PCR des das Gen enthaltenen Plasmids gemacht. Dabei binden die entsprechenden Primer beide innerhalb des *H. pylori*-Gens nahe bei einander, so dass die beiden 5'-Enden der Primer zueinander stehen. Die Elongation durch die Polymerase läuft dadurch aus dem *H. pylori*-Gen, über den Vektor und wieder ins *H. pylori*-Gen hinein, so dass an beiden Enden des PCR-Produktes Fragmente des Gens mit flankierenden Restriktionsschnittstellen entstehen. Die inverse PCR wurde mit dem „Expand High Fidelity PCR System“ (siehe Abschnitt 3.2.4) durchgeführt. Für die weiteren Klonierungsschritte wurden Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen BglII oder BclI eingebracht.

3.4.4 Unterbrechung des Gens durch eine Antibiotika-Resistenzkassette

Für die Unterbrechung von Genen wurden zwei verschiedenen Antibiotika-Resistenzkassetten verwendet. Zum einen die *cat*-Kassette, welche Resistenz gegen Chloramphenicol vermittelt, zum anderen die *aphA3'*-III-Kassette welche die Bakterien Kanamycin-resistent macht.

Die Isolierung von *aphA3'*-III erfolgte aus dem Plasmid pILL600 (Labigne-Roussel *et al.*, 1988). Die Kassette wird in pILL600 auf beiden Seiten von mehreren Restriktionsschnittstellen flankiert (z.B. BamHI). Die Klonierung der Kassette in die inversen PCR-Produkte erfolgte in dieser Arbeit ausschließlich über eine BamHI/BglII- bzw. BamHI/BclI-Ligation. Dazu wurde das Plasmid mit BamHI verdaut und die ca. 1400 Bp große Kassette aus einem Agarosegel extrahiert. Das so erhaltene Fragment konnte direkt für weitere Schritte eingesetzt werden.

Die *cat*-Kassette wurde mit Hilfe des „Expand High Fidelity PCR System“ sowie den Primern pcat-1 und pcat-2 amplifiziert, wobei durch den Primer pcat-2 eine neue BamHI-Schnittstelle eingebracht wurde. Das PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und anschließend mit BamHI verdaut. Dabei wurde eine natürliche BamHI-Schnittstelle sowie die neu eingebrachte Schnittstelle genutzt. Nach der Restriktion wurde der Ansatz über „QIAquick“-Säulen gereinigt und mit 30 µl EB-Puffer eluiert.

Das Produkt der inversen PCR wurde ebenfalls mit dem entsprechenden Enzym verdaut (BglII oder BclI) und über „QIAquick“-Säulen gereinigt. Da BamHI, BglII und BclI ssDNA-Überhänge mit der gleichen Sequenz (5'-GATC-3') produzieren, konnte nun eine der Resistenzkassetten mit dem Produkt der inversen PCR ligiert werden. Dazu wurde das „Quick Ligation Kit“ nach Protokoll des Herstellers genutzt. 5 µl des Ligationsansatzes wurden zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen genutzt (vgl. Abschnitt 3.4.2).

Durch Restriktionsanalysen und PCR wurde die Richtigkeit der isolierten Plasmide sowie die Lage der Resistenzkassette kontrolliert (Tabelle 17). Für die Transformation von *H. pylori* wurden nur die Plasmide verwendet, in denen die Leserichtung der Kassette und die des Gens übereinstimmten. Die Kanamycin-Resistenzkassette besitzt einen starken Promotor aber keinen eigenen Terminator. Durch die gleiche Leserichtung von Gen und Kassette wurde das Risiko polarer Effekte vermindert (Schmitz *et al.*, 1997).

Tabelle 17: Primer und Plasmide zur Inaktivierung von *H. pylori*-Genen

Gen	Primer		Plasmid ¹ (Größe)	Inaktiviert durch ²		Kontroll-Restriktion ³	
	Klonierung	Inverse PCR		Kassette	Deletion [Bp]	RE	Fragmente [Bp]
<i>comB10</i>	HPcomB10-1s	HPcomB10-3s	pSUS2513 (5186 Bp)	<i>aphA3'</i> -III	25	HindIII	4575, 516, 95
	HPcomB10-2s	HPcomB10-4s					
<i>mutY</i>	HPmutY-1	HPmutY-3	pSUS2508 (5296 Bp)	<i>aphA3'</i> -III	5	HindIII	2865, 1332, 685, 414
	HPmutY-2	HPmutY-4					
<i>nth</i>	HPnth-1PstI	HPnth-3BglII	pSUS2540 (4792 Bp)	<i>cat</i>	96	HindIII	3845, 947
	HPnth-2PstI	HPnth-4BglII					
<i>recB</i>	HP1553-1PstI	HP1553-3BclI	pSUS2535 (6432 Bp)	<i>cat</i>	215	SphI	4135, 1323, 974
	HP1553-2PstI	HP1553-4BclI					
<i>recA</i>	HPrecA-1s	HPrecA-3s	pSUS2511 (5149 Bp)	<i>aphA3'</i> -III	7	HindIII	2887, 1727, 535
	HPrecA-2s	HPrecA-4s					
<i>recG</i>	HP1523-1PstI	HP1523-3BglII	pSUS2534 (5536 Bp)	<i>cat</i>	107	HindIII	3897, 1149, 490
	HP1523-2PstI	HP1523-4BglII					
<i>recJ</i>	HPrecJ-1s	HPrecJ-3s	pSUS2510 (5578 Bp)	<i>aphA3'</i> -III	3	HindIII	3167, 1574, 837
	HPrecJ-2s	HPrecJ-4s					
<i>recN</i>	HP1393-1PstI	HP1393-3BglII	pSUS2532 (5379 Bp)	<i>cat</i>	121	HindIII	3860, 1519
	HP1393-2PstI	HP1393-4BglII					
<i>recR</i>	HP0925-1PstI	HP0925-3BglII	pSUS2530 (4689 Bp)	<i>cat</i>	171	HindIII	3698, 991
	HP0925-2PstI	HP0925-4BglII					
<i>ung</i>	HPung-1PstI	HPung-3BglII	pSUS2541 (4843 Bp)	<i>cat</i>	98	KpnI	3278, 1556
	HPung-2PstI	HPung-4BglII					

Gen	Primer		Plasmid ¹ (Größe)	Inaktiviert durch ²		Kontroll-Restriktion ³	
	Klonierung	Inverse PCR		Kassette	Deletion [Bp]	RE	Fragmente [Bp]
<i>xseA</i>	HPxseA-1s	HPxseA-3s	pSUS2525 (4823 Bp)	<i>cat</i>	28	BglI	3098, 1118,
	HPxseA-2s	HPxseA-4s					521, 86
<i>xth</i>	HP1526-1s	HP1526-3s	pSUS2520 (5194 Bp)	<i>aphA3</i> '-III	39	HindIII	2808, 1688,
	HP1526-2s	HP1526-4s					564, 134

1: Plasmide für die natürliche Transformation von *H. pylori* zur Inaktivierung von Genen; 2: Veränderungen zur Unterbrechung des Gens; 3: Zur Kontrolle verwendete Restriktionsendonuklease sowie aus den Verdau resultierende Fragmentgrößen

Eine schematische Übersicht der Klonierungsschritte zur Unterbrechung eines *H. pylori*-Gens ist in Abbildung 6 am Beispiel des Gens *comB10* dargestellt.

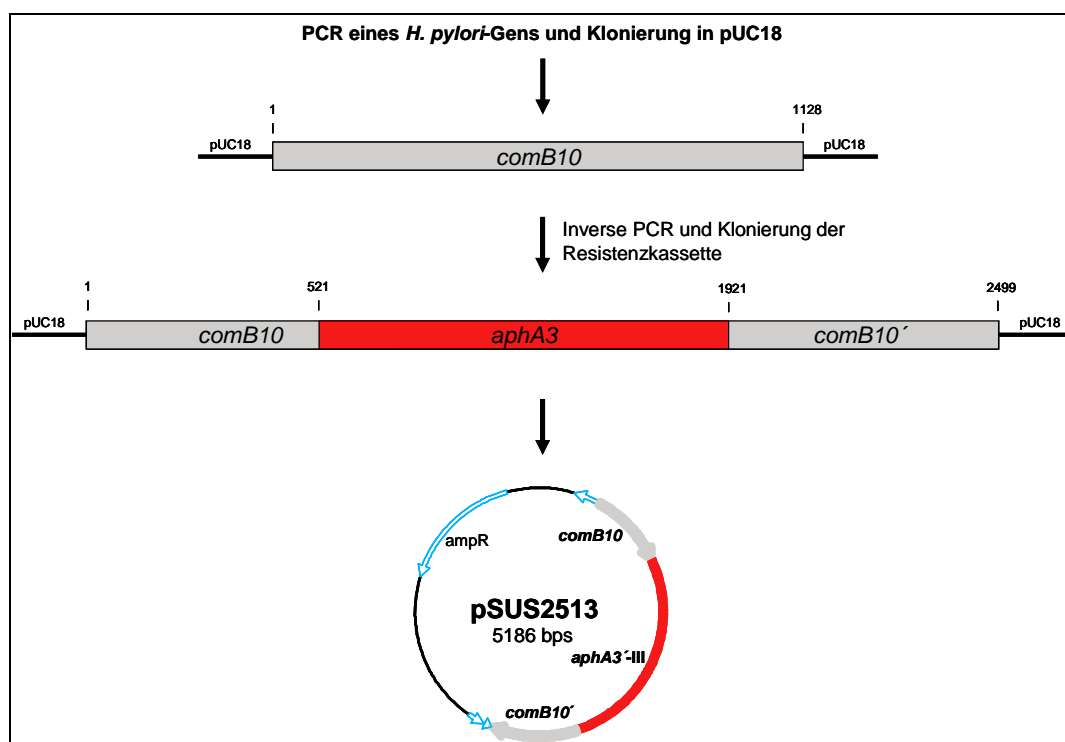


Abbildung 6: Herstellung eines Plasmids zur Inaktivierung des Gens *comB10* in *H. pylori*

3.4.5 Natürliche Transformation von *H. pylori*

Zur Inaktivierung eines *H. pylori*-Gens wurde ein *H. pylori* Wildtyp-Stamm (26695, J99 oder N6) 24 Stunden auf Blutagar inkubiert. Ein kleiner Teil der Bakterien wurde auf eine neue Blutagarplatte gebracht und für 2-4 h inkubiert und 5 µl eines Plasmids, welches das gewünschte unterbrochene Gen enthielt, auf die Bakterien getropft und verteilt. Die Bakterien wurden über Nacht bebrütet, anschließend mit einer Impföse abgenommen und auf selektive Blutagarplatten mit Kanamycin, Chloramphenicol oder beiden ausgestrichen. Nach 5-6 Tagen

Inkubation konnten Einzelkolonien isoliert und vervielfältigt werden. Von diesen wurde DNA isoliert und mittels PCR die Richtigkeit der Klone überprüft. Positive Klone wurden bei -80°C eingelagert.

3.5 Untersuchung von *H. pylori* im *in vitro*-Transformationssystem

Zur Untersuchung der Rekombination in *H. pylori* wurde ein *in vitro*-Transformationssystem entwickelt (Kraft, 2004), das es ermöglichte, die Frequenz Rif-resistenter Klone durch Mutation und nach der Zugabe von DNA eines Rif-resistenten Stammes (Rekombination) sowie die in das Genom integrierten DNA-Importe von *H. pylori* Wildtyp- und Mutantenstämmen genauer zu charakterisieren.

Die zu untersuchenden Stämme (Rezipienten) wurden 24 Stunden auf Blutagarplatten kultiviert, die bei *H. pylori*-Mutanten die entsprechenden Selektivantibiotika (Chloramphenicol und/oder Kanamycin) enthielten (siehe Abschnitt 3.1.1). Die Bakterien wurden abgeerntet und zur Inokulation von 10 ml BHI (siehe Abschnitt 3.1.1) mit einer Bakterienanzahl von $2,1 \times 10^7$ Bakterien/ml genutzt (bei Mutanten mit den entsprechenden Antibiotika). Diese Vorkulturen wurden für 20-24 h unter mikroaerober Atmosphäre inkubiert (37°C, 175 rpm). Nach Messung der OD₆₀₀ wurden die Bakteriensuspensionen genutzt, um je drei 10 ml Kulturen pro Stamm mit $1,5 \times 10^7$ Bakterien/ml zu beimpfen (ohne Selektivantibiotika). Die Flüssigkulturen wurden für 16 Stunden inkubiert (37°C, 175 rpm). Anschließend wurde die OD₆₀₀ der Bakteriensuspensionen gemessen und zwei der drei Kulturen mit genomischer DNA (1 µg/ml, aus einer „Genomic-tip 100/G“-Präparation) der Rif-resistenten Stämme 26695-R1, J99-R3 oder N6-R1 (Donor-DNA) gemischt. Nach weiterer Kultivierung für 8 Stunden wurde erneut die OD₆₀₀ der Kulturen ermittelt. Von den mit Donor-DNA inkubierten Bakterienkulturen wurden 10^8 , 10^7 und 10^6 Bakterien auf Rif-enthaltene Blutagarplatten (10 µg/ml) verteilt und für fünf Tage bebrütet. Parallel dazu wurden von der dritten Kultur (Kultur ohne Donor-DNA) 10^8 Bakterien auf selektiven Blutagar ausplattiert, um die Frequenz Rif-resistenter Spontanmutanten zu ermitteln. Zur Bestimmung der Mutations- bzw. Rekombinationsfrequenzen wurden die Bakterienkolonien ausgezählt und zur Anzahl ausplattierter Zellen ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 16A). Von jedem Experiment wurden mindestens 16 Klone genutzt, um DNA für die Sequenzierung eines 1663 Bp großen Fragments des *rpoB*-Gens (siehe Abschnitt 3.7) zu isolieren.

Für jeden *H. pylori*-Wildtypstamm wurde ein solches Experiment mindestens zehnmal, für jeden Mutantenstamm mindestens dreimal wiederholt.

Zusätzlich zur Transformation des Rezipienten 26695 mit genomischer DNA des Stammes J99-R3 wurde auch ein PCR-Produkt des Donor-Stammes für die Transformation eingesetzt. Das PCR-Fragment wurde mit den Primern HPrpoB-1 und HPrpoB-6 und J99-R3 DNA als Matrize mit Hilfe des „Expand High Fidelity PCR System“ amplifiziert. Analog zur genomischen DNA wurde das PCR-Fragment mit 1 µg/ml in der Transformation eingesetzt.

3.6 Elektroporation von *H. pylori*

Für die Elektroporation wurden die Bakterien wie in Abschnitt 3.5 beschrieben in zwei 10 ml Flüssigkulturen angezüchtet. Wenn die Kulturen eine Bakteriendichte von 3×10^8 Bakterien/ml erreicht hatten, wurden sie durch Zentrifugation sedimentiert ($5000 \times g$, 4°C, 15 min) und in 1 ml einer Glyzerin-Lösung (10%) aufgenommen. Zum Waschen der Bakterien wurde diese Prozedur zweimal wiederholt, das Bakteriensediment danach in 1 ml der Glyzerin-Lösung aufgenommen und auf Eis gestellt.

10 µl genomische DNA aus einer „Genomic-tip 100/G“-Präparation wurden für die Elektroporation über eine Nitrocellulose-Membran (0,025 µm Porengröße, Millipore) in HPLC-gereinigtem H₂O dialysiert und auf Eis gelagert.

90 µl der Bakterienzellen wurden mit genomischer DNA (1 µg) gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,1 cm, Biorad) gegeben. Die Elektroporation wurde im „Gene Pulser“ (Biorad) durchgeführt (2,5 kV, 25 µF und 400 Ω). Die Bakterien wurden sofort mit 100 µl BHI gemischt und anschließend in 1,8 ml BHI überführt. Die 2 ml-Kulturen wurden für 8 h in mikroaerober Atmosphäre inkubiert (37°C, 200 rpm). 10^8 , 10^7 und 10^6 Bakterien wurden auf selektiven Rif-enthaltenden Blutagarplatten verteilt und für 5 Tage inkubiert. Parallel wurde die gleiche Prozedur ohne die Zugabe von DNA durchgeführt. Die Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 3.5 beschrieben. Von jedem Experiment wurden 16 Klone zur Sequenzierung eines Fragments des *rpoB*-Gens weiter verarbeitet.

3.7 Sequenzierung des *rpoB*-Gens

Zur Analyse der DNA-Importe nach Transformation oder Elektroporation von *H. pylori* mit Donor-DNA eines Rif-resistenten Stammes wurde ein 1663 Bp langes Fragment des *rpoB*-Gens sequenziert. Das Fragment umfasste die Nukleotide von Position 752 bis 2415 des *rpoB*-Gens und beinhaltete die meisten Mutationen, die für Rif-Resistenz in *H. pylori* bisher beschrieben wurden (Heep *et al.*, 1999; Heep *et al.*, 2000a; Heep *et al.*, 2000b) einschließlich der Rif-Resistenz vermittelnden Punktmutationen der Donor-Stämme.

Für die Sequenzierung wurde ein PCR-Fragment des *rpoB*-Gens (2370 Bp) mit den Primern HPrpoB-1 und HPrpoB-6 amplifiziert. Dieses PCR-Produkt wurde als Matrize für die Kettenabbruchreaktion mit den Primern HPrpoB-3, -4, -5, -6, -9w und -10 genutzt. Die Sequenzierung wurde, wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben, durchgeführt. Die sechs Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms „Bionumerics V4.5“ zu einer 1663 Bp langen, doppelsträngigen Sequenz des *rpoB*-Gens zusammengesetzt, welche die Rif-Resistenz vermittelnde Punktmutation des Donor-Stammes beinhaltete.

3.8 Analyse der Mutationsfrequenzen in *H. pylori*

Für die Berechnung der Mutationsfrequenzen der Stämme 26695, J99 und N6, deren isogene *mutY*-Mutanten sowie den Isolaten Ala15 und SA166A wurden Bakterienkulturen, wie in Abschnitt 3.5 beschrieben, angezüchtet. Von den Bakteriensuspensionen wurden 10^8 , 10^7 und 10^6 Bakterien in Doppelbestimmung auf selektiven Blutagar (Rifampicin, 10 mg/ml) ausplattiert und für fünf Tage inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienkolonien ausgezählt, wobei Platten, die mehr als 500 Kolonien aufwiesen, nicht berücksichtigt wurden. Für jeden Stamm wurde dieses Experiment mindestens dreimal wiederholt und aus den erhaltenen Werten die Mutationsfrequenz berechnet. Vier bis fünf Kolonien wurden von jeder Platte abgenommen, um die Verteilung der Rif-Resistenz vermittelnden Mutationen zu analysieren (siehe Abschnitt 3.9).

Um die Ergebnisse der durch die zuvor beschriebene Methode ermittelten Mutationsfrequenzen zu verifizieren, wurden die Stämme 26695, 26695*mutY* und SA166A zusätzlich mit Hilfe der Methode nach Bjorkholm *et al.* untersucht (Bjorkholm *et al.*, 2001b). Dazu wurde eine Einzelkolonie der Stämme isoliert und zweimal auf Blutagar passagiert.

Diese Bakterien wurden genutzt, um eine 10 ml-Vorkultur zu beimpfen (vgl. Abschnitt 3.5), welche für 24 Stunden inkubiert wurde (37°C, 175 rpm). Von der Kultur wurden 30 µl auf selektive Blutagarplatten (Rif) verteilt, um zu überprüfen, ob bereits Rif-resistente Bakterien in der Kultur vorhanden waren. Wenn nach fünf Tagen Inkubation eine oder mehrere Kolonien gewachsen waren, wurde das Experiment verworfen.

Außerdem wurde die Vorkultur genutzt, um 20 Einmilliliter-Kulturen mit $<10^4$ Bakterien/ml anzuimpfen, welche für 48 h in mikroaerober Atmosphäre inkubiert wurden (37°C, 200 rpm). Drei der Kulturen wurden genutzt, um die Lebendzellzahl zu bestimmen. Die restlichen 17 Kulturen wurden zentrifugiert ($3000 \times g$, 4°C, 10 min), der Überstand verworfen und das Sediment in 200 µl BHI aufgenommen. Davon wurden je 100 µl auf Rif-haltige Blutagarplatten ausgestrichen und die Platten für fünf Tage inkubiert. Die auf den Platten gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und zur Bestimmung der Mutationsfrequenz genutzt:

Formel 3

Mutationsfrequenz = Median der Anzahl Rif-resistenter Klone / Lebendzellzahl.

Da der Stamm 26695*mutY* sehr hohe Mutationsfrequenzen aufwies, wurden in diesem Fall nur 10 µl und 100 µl der Kulturen ausplattiert und zur Berechnung der Frequenz verwendet.

3.9 Analyse der Rifampicin-Resistenz vermittelnden Mutationen im *rpoB*-Gen

*3.9.1 Positionen der Mutationen im *rpoB*-Gen*

Um die Lage der Mutationen im *rpoB*-Gen zu bestimmen, die Rifampicin-Resistenz verursachen, wurde ein 731 Bp langes Fragment (Position 1318-2048) des Gens Rif-resistenter Klone der Wildtyp-Stämme 26695, J99, N6, Ala15 und SA166A sowie der *mutY*-Mutanten 26695*mutY*, J99*mutY* und N6*mutY* sequenziert. Der sequenzierte Bereich umfasste die meisten Positionen, an denen Rif-Resistenz vermittelnde Mutationen für *H. pylori* beschrieben wurden (Heep *et al.*, 1999; Heep *et al.*, 2000a; Heep *et al.*, 2000b). Für die PCR-Amplifikation sowie die Sequenzierung beider DNA-Stränge des Fragments wurden die Primer HPrpoB-3 und HPrpoB-4 genutzt (vgl. Abschnitt 3.2.7). Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms „Bionumerics V4.5“ zusammengesetzt und die Lage der Mutationen durch Vergleich der Sequenzen der Klone mit den Sequenzen der Wildtyp-Stämme ermittelt.

3.9.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für ausgesuchte Spontanmutationen

Um mögliche Unterschiede in der Resistenz gegen Rifampicin verschiedener Punktmutationen im *rpoB*-Gen zu ermitteln, wurde ein E-Test (AB Biodisk, Solna, Schweden) durchgeführt. Der Teststreifen hatte einen Rif-Konzentrationsgradienten von 0,016-256 µg. Zur Untersuchung wurden die Bakterien von weniger als 24 h inkubierten Blutagarplatten abgenommen und in BHI suspendiert. Von der Bakteriensuspension wurden 1×10^8 Bakterien auf nichtselektive Blutagarplatten ausgestrichen und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein Teststreifen in die Mitte der Platte gelegt. Die Platten wurden für 48 h bei 37°C inkubiert. Anschließend konnte die minimale Hemmkonzentration für den jeweiligen Bakterienstamm anhand der Skala auf den Teststreifen nach den Angaben des Herstellers ermittelt werden.

3.10 Wachstumskurven und kompetitive Ko-Kultivierung von *H. pylori*

Zur Bestimmung des Wachstums von *H. pylori*-Stämmen wurden diese für maximal 24 h auf Blutagarplatten kultiviert und genutzt, um 40 ml-Kulturen mit einer Bakteriendichte von $1,5 \times 10^7$ Bakterien/ml zu beimpfen. Die 40 ml-Kulturen wurden für 72 h in mikraerober Atmosphäre inkubiert (37°C, 175 rpm). Alle 12 h wurde die OD₆₀₀ ermittelt.

Um zu überprüfen, ob die Inaktivierung des *mutY*-Gens einen Einfluss auf die Fitness von *H. pylori* hat, wurden der Wildtyp-Stamm 26695 und die isogene *mutY*-Mutante in einer Ko-Kultivierung untersucht. Dazu wurden Vorkulturen (10 ml) der beiden Stämme mit einer Bakteriendichte von $2,1 \times 10^7$ Bakterien/ml beimpft und für 17 h in mikraerober Atmosphäre inkubiert (37°C, 175 rpm). Die Vorkulturen wurden genutzt, um für jeden Stamm eine Bakteriensuspension (20 ml BHI) mit $1,5 \times 10^7$ Bakterien/ml herzustellen. Die beiden Suspensionen wurden vereinigt, die OD₆₀₀ der Kultur gemessen und die Bakterien für 72 h inkubiert. Nach 0, 12, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 60 und 72 h wurden aus der Kultur 1 ml Proben abgenommen und zur Messung der OD₆₀₀ sowie zur Ermittlung der Gesamtbakterienzahl und der Anzahl an Kanamycin-resistenten Bakterien (d.h. 26695*mutY*) genutzt. Dazu wurden von den Proben Volumina auf selektiven (mit Kanamycin) und nichtselektiven Blutagarplatten verteilt, die einer Anzahl von 200 bzw. 100 Bakterien entsprachen. Die Platten wurden für fünf Tage inkubiert und anschließend die gewachsenen Kolonien gezählt. Die Anzahl der Kolonien auf nichtselektiven Platten stellte die

Gesamtlebendzellzahl dar. Auf den selektiven Platten konnten nur die *mutY*-Mutanten wachsen.

3.11 Statistik

Die statistischen Analysen der Mutations- und Transformationsfrequenzen sowie die Analyse der DNA-Importe wurden von unserem Kooperationspartner Dr. Xavier Didelot, Department of Statistics, University of Warwick mit Hilfe des Vergleiches Bayes'scher Modelle durchgeführt. Dabei wurde die Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines der Modelle durch den Bayes Faktor (BF) gemessen (Goodman, 1999; Kass und Raftery, 1995). Dadurch ist es möglich, zwei konkurrierende Hypothesen miteinander zu vergleichen und die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten einer der Hypothesen zu berechnen. Der BF und damit die Aussage über die Signifikanz der Unterschiede wurde nach Jeffreys interpretiert (Jeffreys, 1961): Negativ (<1), nicht mehr als eine Vermutung (≥ 1 bis <3), beträchtlich (≥ 3 bis <10), stark (≥ 10 bis <30), sehr stark (≥ 30 bis <100), entscheidend (≥ 100). Wenn der BF nicht direkt berechnet werden konnte, wurde der BF mit Hilfe des Schwarz Kriteriums (BIC, englisch: „Bayes Information Criterion“), eine Approximation des Logarithmus des BF, ermittelt (Kass und Raftery, 1995; Schwarz, 1978).

Die Signifikanz der Unterschiede der Transformations- bzw. Mutationsfrequenzen von Stämmen wurde durch den Vergleich zweier Modelle überprüft. Dabei ging ein Modell davon aus, dass die Daten beider Stämme derselben Normalverteilung unterlagen, das andere nahm an, dass es sich um zwei unabhängige Normalverteilungen handelte.

Die Länge von DNA-Importen wird häufig durch eine geometrische Verteilung abgeschätzt (Falush *et al.*, 2001; Falush *et al.*, 2003; Fearnhead *et al.*, 2005). Mit Hilfe des BF konnte gezeigt werden, dass dieses Modell auch für die im *in vitro*-Transformationssystem ermittelten Importe besser ist als eine Binomial-Verteilung. Da nicht in allen Sequenzen der exakte Start- und Endpunkt des DNA-Imports ermittelt werden konnte, wurde stattdessen ein Intervall $[m_i; M_i]$ festgelegt, in dem der DNA-Import stattfinden könnte (mit $M_i = \infty$, wenn der Start- oder Endpunkt der Rekombination außerhalb des sequenzierten Bereichs lag) und diese Daten zur Berechnung der mittleren Importlänge verwendet.

Die Verteilung der Länge der DNA-Importe in 3'-Richtung bzw. in 5'-Richtung von der Rif-Resistenz vermittelnden Punktmutation wurde durch den Vergleich eines Modells, bei dem die Importe 3'-wärts und 5'-wärts derselben geometrischen Verteilung folgten, mit einem zweiten, in dem das nicht der Fall war, untersucht.

Für den Vergleich der Anzahl an Unterbrechungen des integrierten Fragments des Donor-Stammes durch Segmente der Rezipienten-Sequenz (ISR) zweier Stämme wurde der BF berechnet. Die Anzahl an Klonen mit ISR innerhalb der Gesamtzahl der sequenzierten Klone eines Stammes folgt einer Binomial-Verteilung. Mit Hilfe der Vorhersage für die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer ISR in der Sequenz eines Klons wurde die Ausprägung der Wahrscheinlichkeit für zwei Rezipient/Donor-DNA Kombinationen miteinander verglichen.

Um einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ISR und den bekannten Erkennungsstellen für Restriktions-Modifikations-Systeme von *H. pylori* zu untersuchen, wurden die in Tabelle 18 dargestellten Erkennungsstellen in rekombinanten Klonen in die statistischen Analysen mit einbezogen.

Eine genaue Beschreibung der statistischen Auswertungen ist in Kulick *et al.* 2008 zu finden (Kulick *et al.*, 2008a).

Tabelle 18: Auf die Beteiligung an der Entstehung von ISR untersuchte Erkennungssequenzen für Restriktions-Modifikations-Systeme in *H. pylori*

Restriktions-Endonuklease	Erkennungssequenz
Hpy99XIP/Hpy99ORF483P	ACGT
Hpy99ORF433P	ACNGT
HpyAVII/Hpy99ORF430P	ATTAAT
HpyAI	CATG
-	CCCGC
-	CCGC
Hpy99VIIP/HpyORF262	CCGG
HpyNI	CCNGG
Hpy99IV	CCNNGG
Hpy99V/HpyAVI	CCTC
HpyF14I	CGCG
-	CGGCCG
Hpy99I	CGWCG
-	CTGCAG

HpyHI	CTNAG
HpyAII/HpyORF1366/Hpy99ORF1442P	GAAGA
-	GAGG
-	GAGGAG
HpyAIV/HpyHOF1351/Hpy99IXP	GANTC
HpyAIII/HpyORF91/Hpy99VIP	GATC
-	GCCGGC
Hpy99III	GCGC
-	GCGCGC
-	GCNGC
Hpy178VI	GGATG
Hpy178VII	GGCC
HpyF71II	GGNCC
-	GMATC
HpyAIXP/Hpy99ORF845P	GTNNAC
Hpy99II	GTSAC
-	TCGA
Hpy166I	TCNGA
HpyAORF368P/Hpy99ORF1012P	TCNNGA
-	TCTTC
Hpy788669P	TGCA
-	TTTAAA

(Lin *et al.*, 2001; Vale und Vitor, 2007; Vitkute *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2000)

3.12 Bioinformatik

In dieser Arbeit wurden für die Bearbeitung und Auswertung von Sequenzen verschiedene Computerprogramme und Datenbanken verwendet, die in den folgenden Tabellen aufgelistet sind.

Tabelle 19: Programme zur Editierung und Analyse von DNA- und Proteinsequenzen

Programm	Hersteller
Bionumerics	Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien
EditSeq	DNASStar inc., Madison, USA
MegAlign	DNASStar inc.
MapDraw	DNASStar inc.
GeneDoc	http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc
Clonemanager	Sci Ed Central, Cary, USA
psfind	http://www.shigatox.net/cgi-bin/stec/psfind
happlot	http://www.shigatox.net/cgi-bin/stec/happlot

Tabelle 20: Datenbanken und Sequenzvergleiche

Datenbank	Internetadresse
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw
Genolist Pasteur	http://genolist.pasteur.fr
NCBI/Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
TIGR	http://cmr.tigr.org

Tabelle 21: Statistische Analysen und Grafikprogramme

Programm	Hersteller
Origin	OriginLab, Northampton, USA
SigmaStat	Systat, Richmond, USA

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Spontanmutationsrate von *H. pylori*

4.1.1 Frequenz Rifampicin-Resistenz verleihender Spontanmutationen im *rpoB*-Gen in *H. pylori*-Wildtyp-Stämmen

Das *rpoB*-Gen kodiert für die β -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase in Bakterien. Resistenz gegen Rifampicin wird durch Mutationen an verschiedenen Positionen des Gens verursacht. Dadurch eignet sich das Gen sehr gut, um die Frequenz von Spontanmutationen zu untersuchen (Garibyan *et al.*, 2003).

Mit Hilfe der Rif-Resistenz als Mutationsmarker wurden die Mutationsfrequenzen der *H. pylori* Wildtyp-Stämme 26695, J99 und N6 ermittelt. Dazu wurden 10^8 , 10^7 und 10^6 Bakterien auf selektive Blutagarplatten mit Rifampicin (10 $\mu\text{g/ml}$) verteilt und nach fünftägiger Inkubation die Anzahl Rif-resistenter Kolonien bestimmt. Der Mittelwert der Mutationsfrequenzen lag bei $1,1 \times 10^{-6}$, wobei sich die Frequenzen für die drei Stämme signifikant voneinander unterschieden (26695: $1,1 \times 10^{-6}$, J99: $1,6 \times 10^{-6}$, N6: $4,6 \times 10^{-7}$; Abbildung 7).

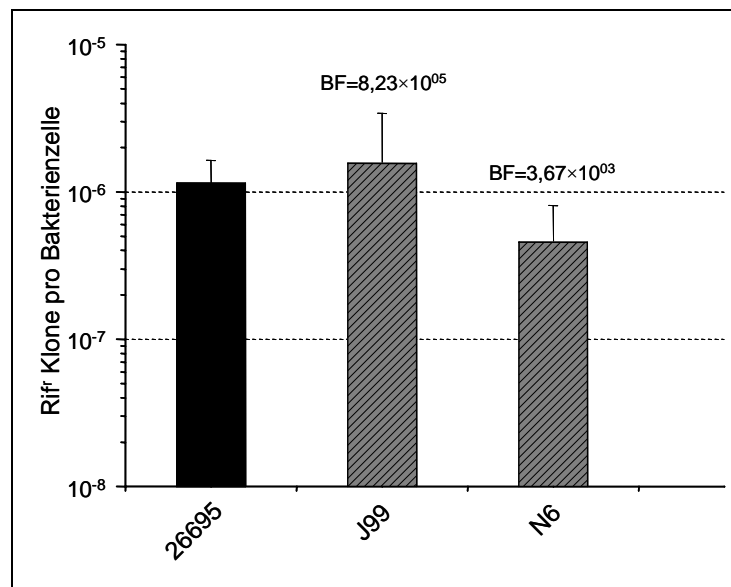


Abbildung 7: Mutationsfrequenzen der *H. pylori* Wildtyp-Stämme

Die Balken zeigen die Mutationsfrequenzen der Stämme 26695, J99 und N6. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Die Signifikanz der Unterschiede wurde in Bezug auf den Stamm 26695 (schwarzer Balken) berechnet. Der Bayes Faktor (BF) wurde mit Hilfe des Schwarz Kriteriums (BIC) approximiert. (BF ≥ 100 = entscheidend; Interpretation des BF siehe S. 55) Anzahl der Experimente: 26695: 35, J99: 9, N6: 18

Zur Verifizierung der ermittelten Mutationsfrequenzen wurde der Stamm 26695 zusätzlich mit der Methode nach Bjorkholm *et al.* (siehe Abschnitt 3.8) untersucht (Bjorkholm *et al.*, 2001b). Mit Hilfe dieser Methode wurde für den *H. pylori*-Stamm 26695 eine Frequenz Rif-resistenter Klone pro Bakterienzelle von $7,6 \times 10^{-7}$ ermittelt. Die Werte beider Methoden wichen nicht signifikant voneinander ab.

4.1.2 Untersuchung des Einflusses einer Inaktivierung des *mutY*-Gens auf die Mutationsfrequenz

Analysen der Genome der *H. pylori*-Stämme 26695, J99 und HPAG1 zeigten, dass sie alle drei ein Gen mit Homologie zum *mutY*-Gen von *E. coli* enthalten, das für eine Adenin-spezifische Glykosylase kodiert (HP0142, JHP0130, HPAG1_0140). MutY ist in *E. coli* und vielen anderen Bakterien-Spezies Teil des Basen-Exzisions-Systems und repariert Basenfehlpaarungen zwischen 8-OxoG und A, G und A sowie C und A. Die Aminosäuresequenz des vorhergesagten MutY-Proteins des Stammes 26695 ist zu 34% identisch mit der des MutY-Proteins von *E. coli* K-12 (Blattner *et al.*, 1997). Beide Proteine besitzen hoch konservierte Domänen, wie eine Endonuklease-III-Domäne, eine „Helix-Hairpin-Helix“-Domäne und ein Eisen-Schwefel-Cluster (Guan *et al.*, 1998).

Um die Funktion der Glykosylase in *H. pylori* zu charakterisieren, wurde das *mutY*-Gen in den Stämmen 26695, J99 und N6 durch Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette inaktiviert und die Mutationsrate durch Messung der Frequenz Rif-resistenter Klone pro Bakterienzelle bestimmt. Im Vergleich zu den drei Wildtyp-Stämmen, in denen die Mutationsfrequenzen zwischen $4,6 \times 10^{-7}$ und $1,6 \times 10^{-6}$ lagen, führte der Verlust eines funktionellen MutY-Proteins zu einer etwa 25-fachen Erhöhung der Mutationsfrequenzen der Stämme 26695 und N6 und zu einer 14-fachen Erhöhung im Stamm J99 (Abbildung 8). Auch die Mutationsfrequenz der Mutante 26695*mutY* wurde mit Hilfe der Methode nach Bjorkholm überprüft. Die ermittelte Frequenz lag bei $1,14 \times 10^{-5}$ und wich damit nicht signifikant von dem Wert der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur Bestimmung von Mutationsfrequenzen ab.

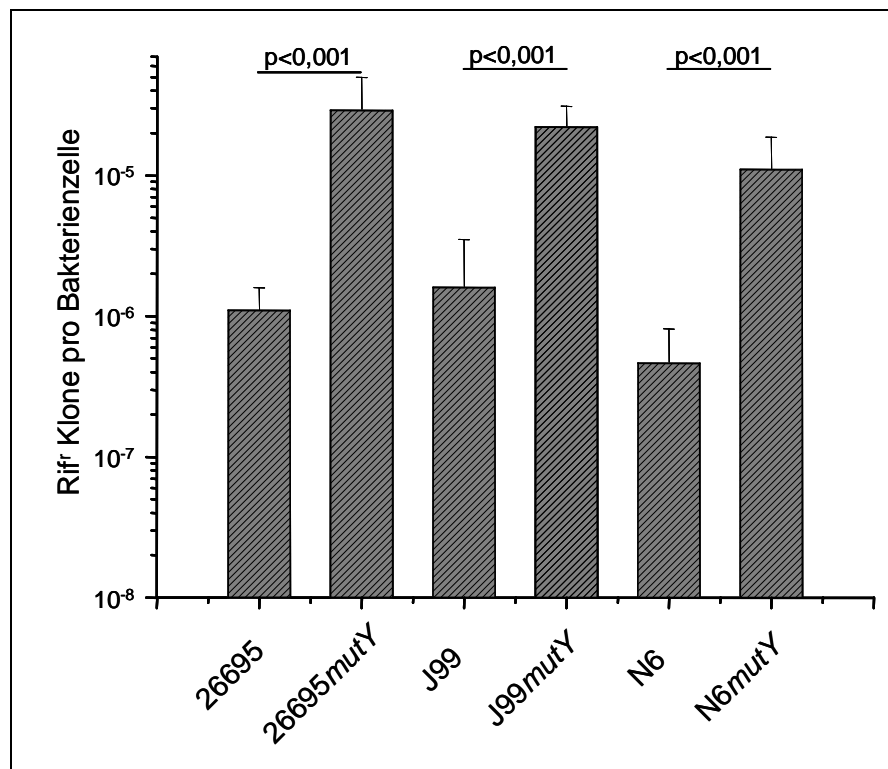


Abbildung 8: Mutationsfrequenzen der *H. pylori* Wildtyp-Stämme und *mutY*-Mutanten

Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Mutationsfrequenzen. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Zwischen den einzelnen Wildtyp-Stämmen und den isogenen *mutY*-Mutanten unterscheiden sich die Frequenzen signifikant ($p < 0,001$; t-Test). Anzahl der Experimente: 26695: 35, 26695*mutY*: 7, J99: 9, J99*mutY*: 6, N6: 18, N6*mutY*: 7

Das *mutY*-Gen wurde durch die Unterbrechung mit einer Kanamycin-Resistenz-Kassette inaktiviert, welche einen eigenen starken Promotor, aber keinen eigenen Terminator besaß. Durch den Einbau der Kassette in das *mutY*-Gen könnte es zu Effekten in Genen kommen, die „downstream“ des *mutY*-Gens liegen (polare Effekte), wie die vorhergesagte L-Lactat-Permease HP0141. Um zu zeigen, dass der Anstieg der Mutationsfrequenz in den *mutY*-Mutanten durch die Inaktivierung des *mutY*-Gens und nicht durch polare Effekte hervorgerufen wurde, wurde der Stamm 26695*mutY* mit einem intakten *mutY*-Gen komplementiert. Das intakte Gen wurde mit Hilfe des Plasmids pADC-HpMutY in das Chromosom des Bakteriums integriert und durch den starken Urease-Promotor reguliert (Huang *et al.*, 2006). Durch die starke Aktivität dieses Promotors konnte in dem komplementierten Stamm eine höhere Konzentration des *mutY*-Transkripts nachgewiesen werden als im Wildtyp-Stamm (Abbildung 9). Mit Hilfe einer quantitativen „Real-Time“-PCR konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an *mutY*-mRNA in der komplementierten Mutante im Mittel 51 Mal höher war als im 26695 Wildtyp-Stamm.

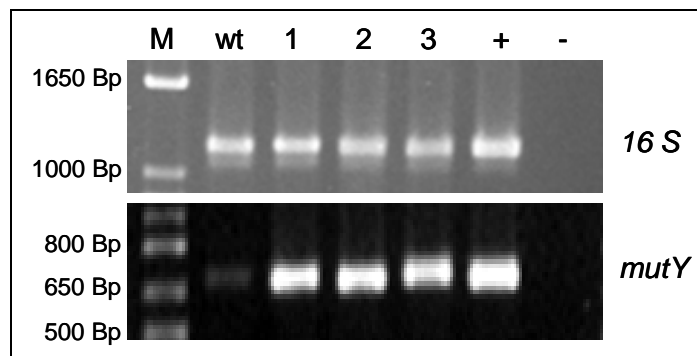


Abbildung 9: Analyse der *mutY*-mRNA-Konzentration in den *H. pylori*-Stämmen 26695 und 26695*mutY*comp mittels semiquantitativer RT-PCR

Im unteren Teil der Abbildung ist das Ergebnis einer semiquantitativen PCR mit den Primern HPmutY1979 und HPmutY1980 dargestellt. Als Kontrolle der Einheitlichkeit der RNA-Konzentration in den einzelnen Proben während der cDNA-Synthese ist im oberen Teil eine semiquantitative PCR eines Fragments der 16S-rRNA dargestellt (Primer: C05 und C97). Wt: 26695 cDNA; 1, 2 und 3: 26695*mutY*comp cDNA; +: 26695 genomische DNA; -: Kontrolle ohne DNA; M: Marker „1 Kb Plus DNA Ladder“

Die komplementierte 26695 *mutY*-Mutante wies eine Frequenz an Rif-resistenten Klonen von $4,4 \times 10^{-7}$ auf, welche damit etwas niedriger war als die Frequenz des Wildtyp-Stammes (nicht signifikant). Die Unterschiede der Mutationsfrequenzen zwischen der *mutY*-Mutante und dem Wildtyp sowie zwischen der *mutY*-Mutante und der komplementierten Mutante waren hoch signifikant (Abbildung 10). Durch die Komplementierung der *mutY*-Mutante mit einem intakten *mutY*-Gen wurde der Phänotyp des Wildtypstammes in Bezug auf die Mutationsfrequenz wieder hergestellt und gezeigt, dass die Glykosylase MutY eine wichtige Funktion als Antimutator in *H. pylori* hat.

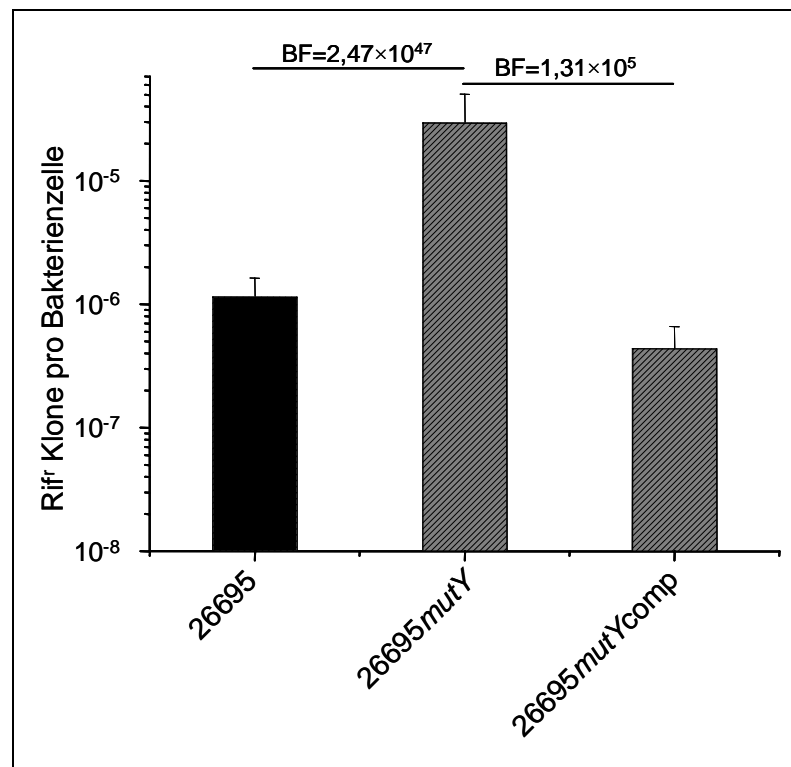


Abbildung 10: Effekt der Komplementierung des *mutY*-Gens auf die Mutationsfrequenz

Die Balken zeigen die Mutationsfrequenzen des Wildtyp-Stammes 26695, der Mutante 26695*mutY* und der komplementierten Mutante 26695*mutYcomp*. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Die Unterschiede zwischen dem Wildtyp-Stamm und der *mutY*-Mutante sowie zwischen der Mutante und dem komplementierten Stamm sind hoch signifikant. Die Frequenzen des Wildtyps und des Stammes 26695*mutYcomp* unterscheiden sich nicht signifikant. Der BF wurde mit Hilfe des BIC approximiert. ($BF \geq 100$ = entscheidend; Interpretation des BF siehe S. 55). Anzahl der Experimente: 26695: 35, 26695*mutY*: 7, 26695*mutYcomp*: 3

4.1.3 Analyse der Verteilung und Art Rif-Resistenz verleihender Punktmutationen in *H. pylori*-Wildtyp-Stämmen und *mutY*-Mutanten

Rif-Resistenz kann in *H. pylori* durch unterschiedliche Punktmutationen im *rpoB*-Gen entstehen (Heep *et al.*, 1999; Heep *et al.*, 2000a; Heep *et al.*, 2000b), was es ermöglicht, die Auswirkung von Geninaktivierungen auf die Verteilung der Rif-Resistenz verleihenden Mutationen zu untersuchen. Um den Effekt der *mutY*-Inaktivierung zu analysieren, wurde für Rif-resistente Mutanten der drei Wildtyp-Stämme und der dazu gehörigen *mutY*-Mutanten ein 731 Bp großes Fragment des *rpoB*-Gens sequenziert, welches die meisten der bekannten Punktmutationen umfasst (Abbildung 11). Die Klone wurden zufällig aus sechs unabhängigen biologischen Experimenten selektiert, wobei maximal fünf Klone pro Platte isoliert wurden.

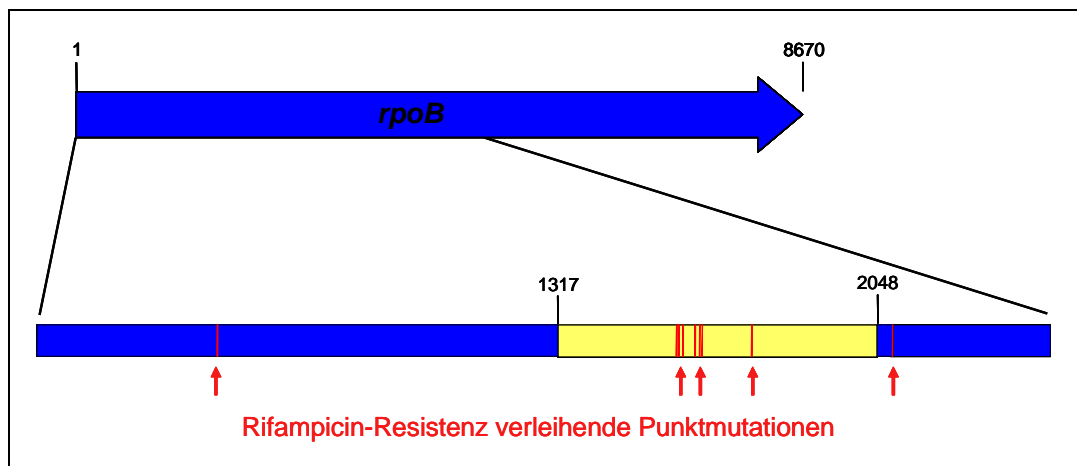


Abbildung 11: Rif-Resistenz verleihende Punktmutationen im *rpoB*-Gen von *H. pylori*

Der blaue Pfeil repräsentiert das *rpoB*-Gen von *H. pylori*. Im unteren Teil ist eine Vergrößerung des Bereiches dargestellt, in dem Rif-Resistenz verleihende Punktmutationen (rote Pfeile) auftreten. Die Verteilung der Punktmutation wurde durch die Sequenzierung eines 731 Bp langen Fragments des *rpoB*-Gens (gelb) untersucht. Die Zahlen geben Positionen im *rpoB*-Gen an.

Im Stamm 26695 wiesen 77% der analysierten Rif-resistenten Klone eine C-zu-A-Transversion (C→A) an der Position 1573 und 8% der Klone eine C→A-Transversion an Position 1618 auf. Bei den restlichen 15% der analysierten Klone befand sich in dem sequenzierten Fragment keine Mutation (Abbildung 12 A). Auch im Stamm N6 war die Transversion an Position 1573 mit 46% am häufigsten. Die weiteren Mutationen dieses Stammes verteilten sich mit 29% auf die Position 1588 (G→A) und 11% auf die Position 1618, von denen 7% eine C→A-Transversion und 4% eine C→T-Transition waren (Abbildung 12 C). Bei 14% der Klone lag die Rif-Resistenz verleihende Mutation außerhalb des sequenzierten Fragments. In den Klonen des *H. pylori*-Stammes J99 waren die Punktmutationen auf acht verschiedene Positionen innerhalb des sequenzierten Fragments verteilt; die häufigste Punktmutation war eine C→T-Transition an Position 1618 (35%, Abbildung 12 E, Tabelle 22).

Die Inaktivierung des *mutY*-Gens führte bei allen drei Stämmen zu einer Verschiebung in der Verteilung der Rif-Resistenz vermittelnden Punktmutationen. Im Stamm 26695*mutY* wurden 78% der Rif-Resistenzen durch eine C→A-Transversion an Position 1618 des *rpoB*-Gens hervorgerufen und 3% der Mutationen waren G→A-Transitionen an Position 1588; 19% der Mutationen lagen nicht im sequenzierten Bereich (Abbildung 12 B). Keiner der analysierten Klone hatte eine Mutation an der bevorzugten Position des Wildtyp-Stammes (1573). Von den Rif-resistenten Klonen des Stammes N6*mutY* trugen 70% eine C→A-Transversion an Position 1618 sowie 30% eine C→A-Transversion an Position 1573 (Abbildung 12 D). Alle Klone des

Stammes J99*mutY*, die eine Punktmutation innerhalb des analysierten *rpoB*-Fragments hatten, wiesen eine C→A-Transversion an Position 1618 auf (92%, Abbildung 12 F, Tabelle 22).

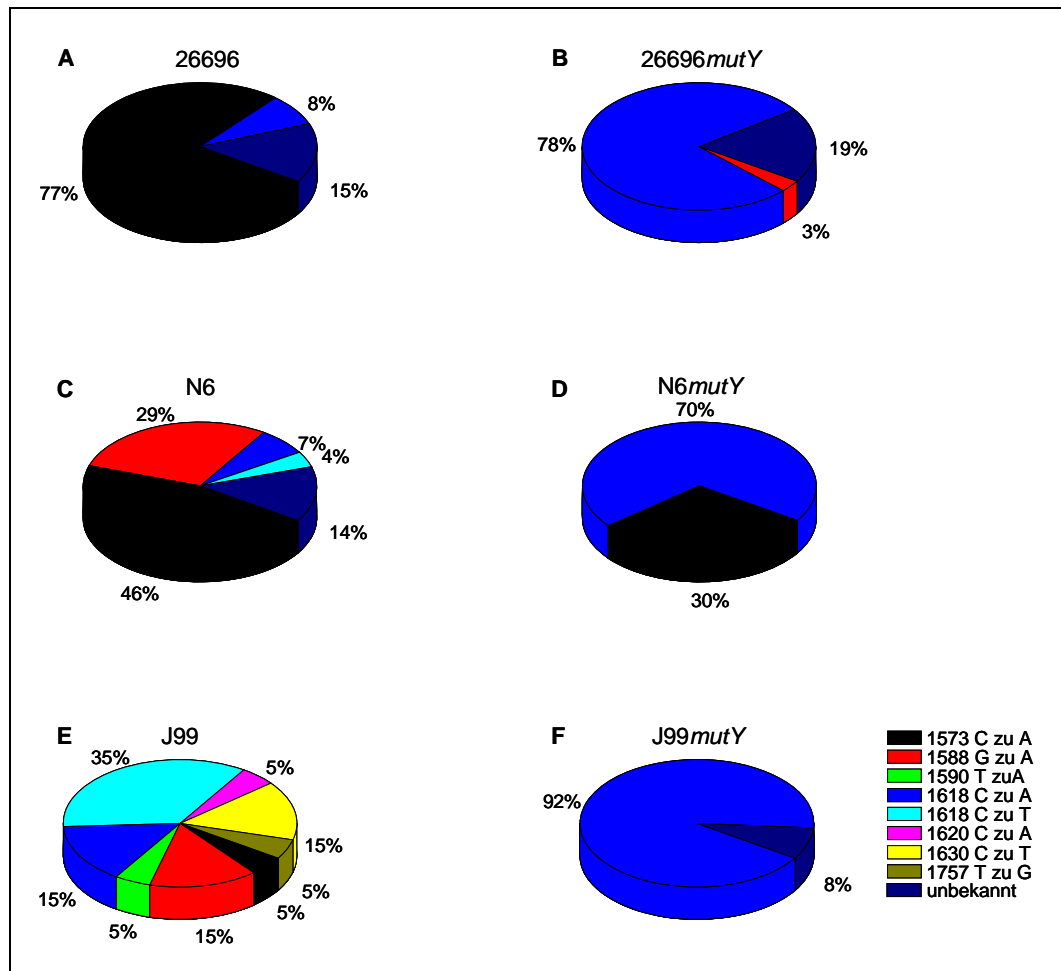


Abbildung 12: Verteilung der Rif-Resistenz verleihenden Punktmutationen in *H. pylori* Wildtyp-Stämmen und *mutY*-Mutanten

Die Diagramme (A-F) zeigen den prozentualen Anteil der einzelnen Positionen von Rif-Resistenz vermittelnden Punktmutationen im Verhältnis zur Gesamtzahl der analysierten Rif-resistenten Klone eines Stammes. Es wurden Klone der drei Wildtyp-Stämme 26695, N6 und J99 (A, C, E) sowie der isogenen *mutY*-Mutanten analysiert (B, D, F). Die Anzahl der analysierten Klone ist in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Lage der Punktmutationen im *rpoB*-Gen Rif-resistenter *H. pylori*-Mutanten

Stämme (N ¹)	Anzahl der Klone mit einer Punktmutation an Position:										Σ C zu A ² [%]
	1573 C→A	1588 G→A	1588 G→T	1589 A→T	1590 T→A	1618 C→A	1618 C→T	1620 C→A	1630 C→T	1757 T→G	
26695 (39)	30	0	0	0	0	3	0	0	0	0	6
26695mutY (37)	0	1	0	0	0	29	0	0	0	0	7
N6 (28)	13	8	0	0	0	2	1	0	0	0	4
N6mutY (33)	10	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0
J99 (20)	1	3	0	0	1	3	7	1	3	1	0
J99mutY (26)	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	2
SA166A (40)	2	7	0	13	0	15	0	0	0	0	3
Ala15 (12)	0	1	4	2	0	5	0	0	0	0	0

1: N = Anzahl der analysierten Klone; 2: Anteil der C zu A Transversionen an der Gesamtzahl der Punktmutationen eines Stammes

Um einen Vergleich der Frequenzen der verschiedenen Punktmutationen zwischen Wildtyp-Stämmen und *mutY*-Mutanten zu ermöglichen, wurden die absoluten Frequenzen der einzelnen Mutationen im *rpoB*-Gen berechnet. Die Berechnung zeigte, dass es zwischen den Wildtyp-Stämmen und den isogenen *mutY*-Mutanten keine signifikanten Unterschiede der absoluten Frequenzen von C→A-Transversionen an der Position 1573 gab, wohingegen die Frequenzen der C→A-Transversionen an Position 1618 stark erhöht waren (J99: 87-fach, N6: 244-fach, 26695: 262-fach). Insgesamt hatte die Inaktivierung des *mutY*-Gens nur einen schwachen Effekt auf die Gesamtzahl der C→A-Transversionen. Im Stamm 26695 bestand zwischen dem Wildtyp und der Mutante kein Unterschied in der Gesamthäufigkeit der C→A-Transversionen und der Stamm N6*mutY* zeigte einen 1,9-fachen Anstieg der C→A-Transversionen (nicht signifikant). Nur im Stamm J99*mutY* war eine signifikante 3,7-fache Erhöhung der C→A-Transversionen zu beobachten ($p < 0,02$; berechnet mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests).

4.1.4 Auswirkung der dominierenden Rif-Resistenz vermittelnden Mutationen von Wildtyp-Stamm und mutY-Mutante auf das Wachstum und die Resistenz gegen Rifampicin

Für Rifampicin-Resistenz vermittelnde Punktmutationen wurde in *E. coli* gezeigt, dass sie eine negative Auswirkung auf die bakterielle Fitness und das Wachstum der Bakterien haben (Reynolds, 2000). Um herauszufinden, ob MutY die Position 1618 effizienter vor Mutationen schützt als andere Positionen im *rpoB*-Gen, weil eine Mutation an dieser Stelle zu einer stärkeren Einschränkung des bakteriellen Wachstums/Fitness führt, wurde das Wachstum zweier Rif-resistenter Mutanten untersucht. Die Wachstumskurven wurden mit den Rif-sensiblen Stämmen 26695, 26695*mutY* sowie einer Rif-resistenten Mutante des Stammes 26695 (Punktmutation an Position 1573) und des Stammes 26695*mutY* (Punktmutation an Position 1618) durchgeführt (Abbildung 13).

Die Kulturen wurden mit einer Bakteriendichte von $1,5 \times 10^7$ Bakterien/ml gestartet und über 72 Stunden inkubiert. Alle zwölf Stunden wurde die OD₆₀₀ der Kulturen gemessen. In der Abbildung 13 sind die Mittelwerte von je sechs unabhängigen biologischen Experimenten dargestellt. Zwischen dem 26695 Wildtyp-Stamm und 26695*mutY* gab es keine signifikanten Differenzen im Wachstum. Beide Stämme erreichten nach 36 Stunden ihre maximale optische Dichte (26695: 2,54; 26695*mutY*: 2,23). Die Punktmutationen in der Rif-resistenten *mutY*-Mutante und dem Rif-resistenten Wildtyp-Stamm führten zu einer deutlichen Einschränkung

des bakteriellen Wachstums im Vergleich zu den Rif-sensiblen Stämmen. Die Stämme erreichten nach 36 Stunden eine maximale OD₆₀₀ von 1,1 bzw. 1,2, ebenfalls ohne signifikante Unterschiede untereinander. Die Differenzen im bakteriellen Wachstum zwischen den beiden Stämmen ohne und den beiden Stämmen mit Punktmutation im *rpoB*-Gen nach 36-stündiger Inkubation waren hoch signifikant ($p < 0,001$; berechnet mit Hilfe des t-Tests). Die Untersuchungen zeigten, dass die Inaktivierung des *mutY*-Gens keinen Effekt auf das bakterielle Wachstum hatte, die Rif-Resistenz vermittelnden Mutationen das Wachstum der Bakterien aber stark einschränkten.

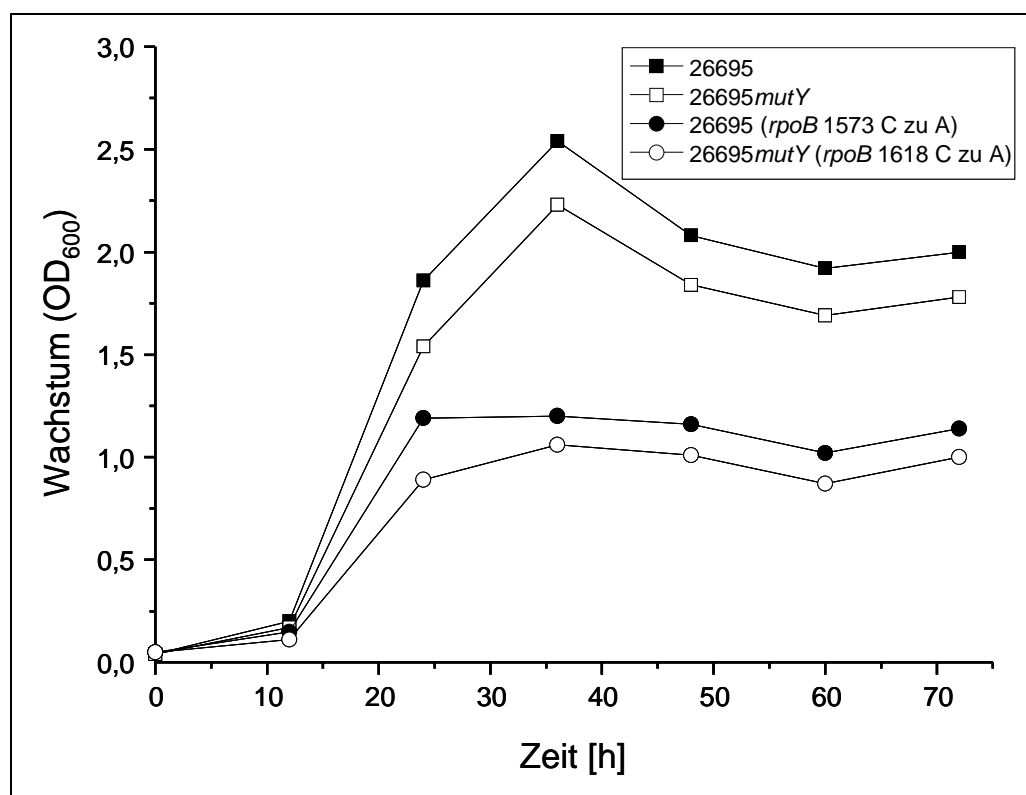


Abbildung 13: Wachstumskurven von *H. pylori*-Stämmen mit und ohne Rif-Resistenz vermittelnde Punktmutation

Die *H. pylori*-Stämme 26695 (schwarze Quadrate), 26695mutY (weiße Quadrate), sowie eine Rif-resistente Mutante des Stammes 26695 mit einer C→A-Transversion an Position 1573 des *rpoB*-Gens (schwarze Kreise) und eine Rif-resistente Mutante des Stammes 26695mutY mit einer C→A-Transversion an Position 1618 (weiße Kreise) wurden für 72 h in BHI inkubiert. Alle zwölf Stunden wurden Proben abgenommen, um die OD₆₀₀ der Kulturen zu bestimmen. Alle Messpunkte in der Abbildung sind Mittelwerte von sechs unabhängigen Wachstumskurven. Die Wachstumskurven der beiden Rif-sensitiven bzw. der beiden Rif-resistenten Stämme zeigten keine signifikanten Differenzen. Die Unterschiede zwischen Rif-sensitiven und Rif-resistenten Stämmen nach 36 h waren hoch signifikant ($p < 0,001$; t-Test).

Um zu testen, ob die beiden häufigsten Punktmutationen im *rpoB*-Gen (Positionen 1573 in Wildtyp-Stämmen und Position 1618 in *mutY*-Mutanten) zu unterschiedlichen Ausprägungen der Resistenz gegen Rifampicin führen, wurde die minimale Hemm-Konzentration (MHK) für

Rifampicin für die Stämme 26695, 26695*mutY* sowie Rif-resistente Mutanten mit der spezifischen Transversion des Wildtyp-Stammes 26695 (Punktmutation an Position 1573) und der Mutante 26695*mutY* (Punktmutation an Position 1618) bestimmt. Der Wildtyp-Stamm hatte eine MHK von 0,83 µg Rifampicin pro Milliliter und für die *mutY*-Mutante lag der Wert bei 0,23 µg/ml. Für die beiden Rif-resistenten Stämme konnte die MHK nicht exakt bestimmt werden, da sie höher war als die maximale Konzentration des E-Teststreifens (>256 µg/ml). Zwischen den beiden Rif-resistenten Mutanten waren keine Unterschiede zu beobachten. Beide Transversionen im *rpoB*-Gen bewirkten eine hochgradige Resistenz gegen Rifampicin, mit einer mehr als 300-fachen Erhöhung der MHK.

4.1.5 Auswirkung der Inaktivierung von *mutY* auf die Fitness von *H. pylori*

Um zu analysieren, ob die Inaktivierung des *mutY*-Gens zu einer Veränderung der bakteriellen Fitness führt, wurden kompetitive Wachstumsversuche mit der 26695 *mutY*-Mutante und dem isogenen Wildtyp-Stamm durchgeführt. Dazu wurden die beiden Stämme zu gleichen Teilen gemischt und über 72 h inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben aus der Kultur entnommen und zur Bestimmung der OD₆₀₀ sowie der Differenzierung der Anteile von Bakterien des Wildtyp-Stammes bzw. der *mutY*-Mutante verwendet. Beide Stämme zeigten keine signifikanten Unterschiede im Wachstum während der lag-Phase und der exponentiellen Phase. Nach zwölf und 24 Stunden Inkubation war eine nicht signifikante Überzahl an Wildtyp-Bakterien zu beobachten (ca. 60% 26695 gegenüber 40% 26695*mutY*). Nach weiteren zwölf Stunden Inkubation (t = 36 h) war der Anteil des Wildtyp-Stammes weiter angestiegen (p = 0,02; t-Test). Dieser Trend setzte sich in der stationären Wachstumsphase fort. Nach 48 Stunden gehörten über 90% der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) zum 26695 Wildtyp-Stamm (Abbildung 14; p<0,001; t-Test). Zu späteren Zeitpunkten konnte kein bakterielles Wachstum auf Blutagarplatten mehr nachgewiesen werden.

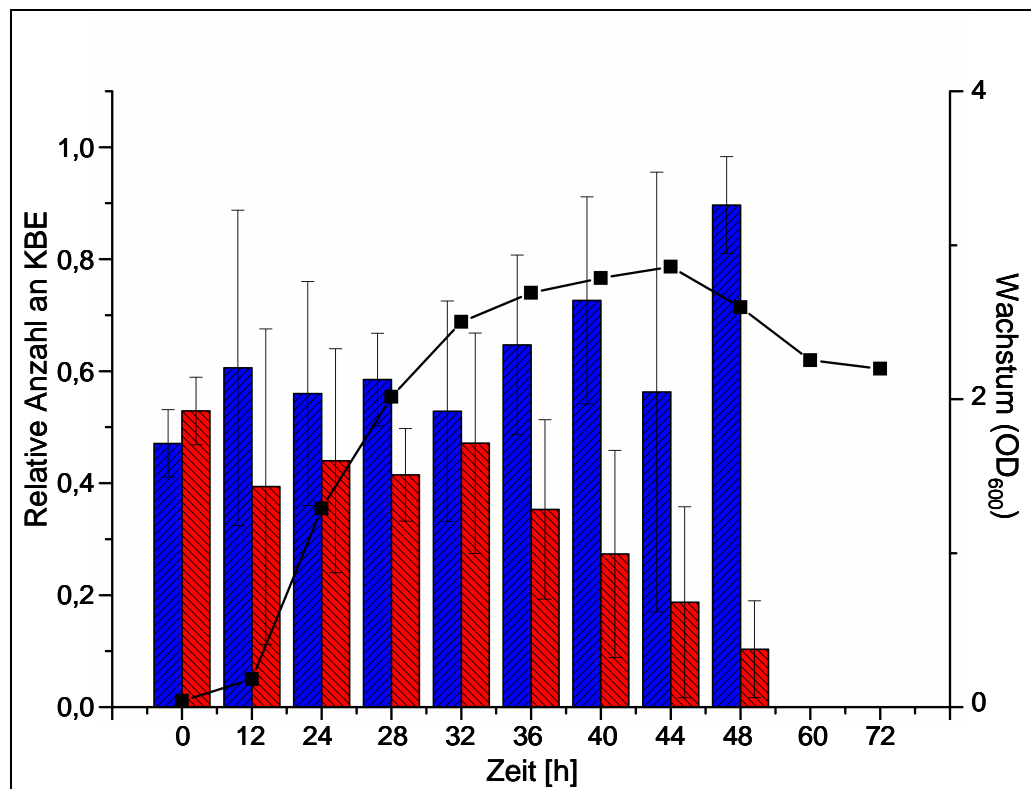


Abbildung 14: Relative Anzahl der *H. pylori*-Stämme 26695 und 26695mutY während der Ko-Kultivierung der Bakterien

Die beiden Stämme 26695 und 26695mutY wurden zusammen in BHI für 72 h kultiviert. Zu bestimmten Zeitpunkten (alle 12 h bzw. 4 h) wurden Proben aus der Kultur entnommen und zur Bestimmung der OD₆₀₀ (schwarze Quadrate) genutzt. Verdünnungen der Proben wurden auf Blutagarplatten mit und ohne Kanamycin-Zusatz ausplattiert, um die Gesamt-Lebendzellzahl und die Anzahl an Kanamycin-resistenten *mutY*-Mutanten zu bestimmen. Die Balken repräsentieren das Verhältnis zwischen dem Wildtyp-Stamm 26695 (blau) und dem Stamm 26695mutY (rot). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Nach 60 h bzw. 72 h konnte auf den Platten kein Wachstum mehr beobachtet werden. Alle Messpunkte in der Abbildung sind Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten.

4.1.6 Untersuchung von klinischen *H. pylori*-Isolaten mit natürlich inaktivierten *mutY*-Genen

Innerhalb der Nukleotid-Sequenz des *mutY*-Gens von *H. pylori* befindet sich eine 8 Bp langer homopolymerer Adenin-„Repeat“, der zu einem „Rutschen“ der Polymerase während der Replikation führen kann. Dadurch kann es zu Phasenvariation und der Inaktivierung des Gens kommen. Diese Sequenzwiederholung liegt im Bereich eines Fragments von *mutY*, das Bestandteil des Multilocus-Sequenztypisierungsschemas für *H. pylori* ist (Achtman *et al.*, 1999; Falush *et al.*, 2003). Es liegen daher in der PubMLST-Datenbank *mutY*-Teilsequenzen für 1634 Stämme vor. Nur drei Sequenzen in dieser Datenbank wiesen eine von der Konsensussequenz abweichende Länge des Adenin-„Repeats“ auf. In den drei Stämmen

Ala15, JP9 und SA166A war die Sequenzwiederholung auf sieben Adenin-Reste verkürzt, was zur Entstehung eines Stopp-Kodons innerhalb des *mutY*-Gens und damit zu einer Inaktivierung des Gens führte.

Die Auswirkung der natürlichen Inaktivierung auf die Mutationsfrequenz im *rpoB*-Gen und die Verteilung der Rif-Resistenz vermittelnden Mutationen wurde in den Stämmen Ala15 und SA166A untersucht. Dazu wurden Einzelkolonien der Stämme isoliert und zunächst durch Sequenzierung die Länge des Adenin-„Repeats“ ($7\times A$) überprüft. Anschließend wurde die Mutationsfrequenz der Isolate bestimmt. Die Mutationsfrequenz des Stammes Ala15 betrug $6,5\times 10^{-7}$ und die des Stammes SA166A $3,6\times 10^{-7}$ Rif-resistente Klone pro Bakterienzelle. Diese Werte waren ähnlich wie die für die drei anderen Wildtyp-Stämme ermittelten Frequenzen und deutlich geringer als die Frequenzen der *mutY*-Mutanten.

Analysen der Verteilung der Rif-Resistenz vermittelnden Punktmutationen im *rpoB*-Gen zeigten, dass diese Ähnlichkeiten mit der Verteilung in den untersuchten *H. pylori mutY*-Mutanten aufwies. Die dominierende Punktmutation in den Stämmen Ala15 und SA166A war wie auch in den *mutY*-Mutanten eine C→A-Transversion an Position 1618 (Ala15: 42%, SA166A: 38%; Abbildung 15, Tabelle 22). Die in den Wildtyp-Stämmen 26695 und N6 häufigste Mutation (C→A-Transversion an Position 1573) war im Stamm SA166A selten (nur 5% der gesamten Mutationen) und trat im Stamm Ala15 überhaupt nicht auf. Die restlichen Punktmutationen befanden sich an den Positionen 1588, 1589 oder außerhalb des sequenzierten 731 Bp großen *rpoB*-Fragments.

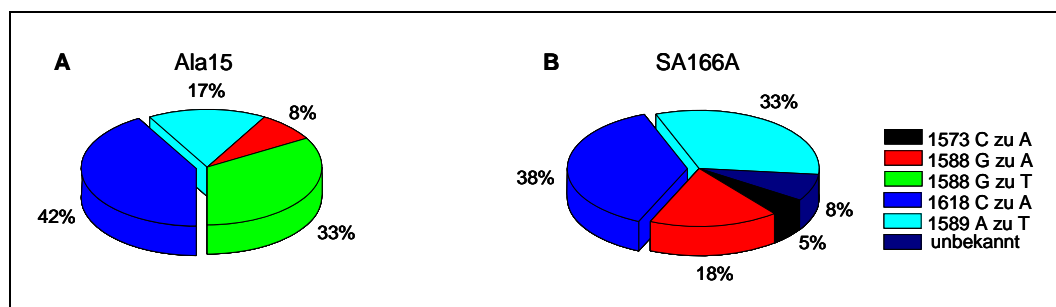


Abbildung 15: Verteilung der Rif-Resistenz verleihenden Punktmutationen in den *H. pylori*-Isolaten Ala15 und SA166A

Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil der einzelnen Positionen von Rif-Resistenz vermittelnden Punktmutationen im Verhältnis zur Gesamtzahl der analysierten Rif-resistenten Klone der Stämme. Es wurden Klone der zwei *H. pylori*-Isolate Ala15 (A) und SA166A (B) analysiert, die beide einen verkürzten Adenin-„Repeat“ ($7\times A$) im *mutY*-Gen hatten. Die Anzahl der analysierten Klone ist in Tabelle 22 dargestellt.

4.2 Untersuchung der Rekombination von *H. pylori*-Wildtyp-Stämmen *in vitro*

4.2.1 Rekombinationshäufigkeiten verschiedener Kombinationen von Rezipienten-Stamm und Donor-DNA

Zur Analyse der Rekombinationsfrequenzen der *H. pylori*-Wildtyp-Stämme 26695, J99 und N6 wurden diese in einem *in vitro*-Transformationssystem (Abbildung 16 A) untersucht. Dazu wurden die Rezipienten-Stämme in einer Flüssigkultur bis zu einer Dichte von etwa 3×10^8 Bakterien pro Milliliter angezüchtet ($OD_{600} = 1$) und dann mit genomischer DNA eines *H. pylori*-Donor-Stammes (26695-R1, J99-R3 oder N6-R1) versetzt, der als Selektionsmarker eine Rif-Resistenz vermittelnde Punktmutation im *rpoB*-Gen aufwies. Anschließend wurden die Stämme für acht Stunden inkubiert. Von der Kultur wurden 10^8 , 10^7 und 10^6 Bakterien auf Selektivplatten mit Rifampicin verteilt und nach fünftägiger Inkubation die Anzahl Rif-resistenter Kolonien gezählt. Parallel wurde eine Kultur ohne den Zusatz von genomischer DNA analysiert, um die Anzahl der durch Mutation entstandenen Rif-resistenten Klone zu ermitteln. Um stammspezifische Unterschiede in der Transformation zu erkennen, wurden unterschiedliche Kombinationen von Rezipient und Donor getestet.

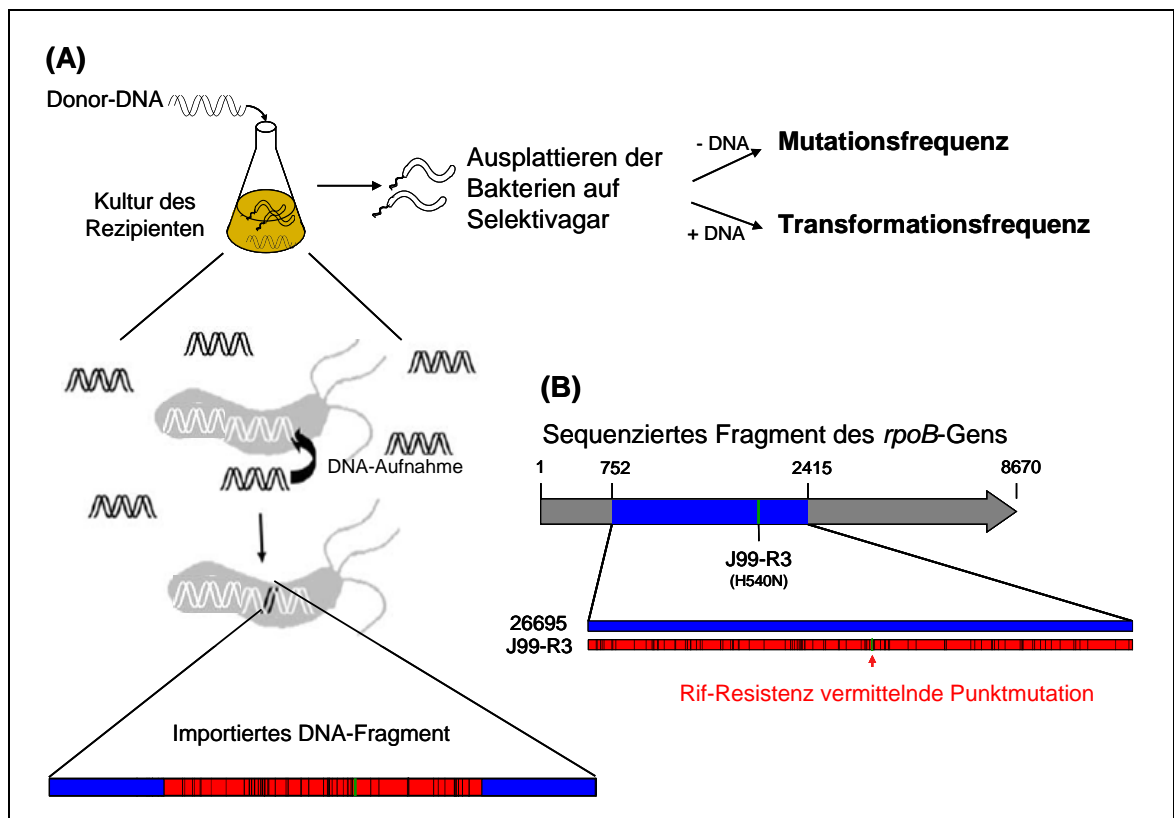


Abbildung 16: Schematische Darstellung des *in vitro*-Transformationssystems zur Analyse der DNA-Importe und Transformation in *H. pylori*

(A) Eine Flüssigkultur des Rezipienten-Stammes wurde mit genomischer DNA eines Rif^r *H. pylori* Donor-Stammes inkubiert. Geeignete Mengen der Bakterien wurden auf selektiven Blutagarplatten verteilt und nach fünftägiger Inkubation die Anzahl Rif-resistenter Kolonien ausgezählt (Transformanten plus Spontanmutanten). Die Mutationsfrequenzen der Stämme wurden ermittelt, indem eine Kultur des Rezipienten ohne DNA-Zugabe auf die gleiche Weise untersucht wurde.

(B) Zur Analyse der DNA-Importlängen wurde ein 1663 Bp langes Fragment des *rpoB*-Gens sequenziert, welches die Rif-Resistenz vermittelnde Punktmutation des Donor-Stammes enthält (blau). Die Sequenz der analysierten Klone wurde mit den Sequenzen des Rezipienten- (hier: 26695, blau) und des Donor-Stammes (hier: J99-R3, rot) verglichen. Die Allele des *rpoB*-Gens der Rezipienten- und Donor-Stämme unterscheiden sich je nach Stammkombination in 3,7-5,5% der Nukleotide, was sich in dem sequenzierten Fragment als 50-92 Polymorphismen widerspiegelt. Diese Polymorphismen ermöglichen die Abschätzung der Start- und Endpunkte der DNA-Importe.

Durch die Inkubation mit Donor-DNA erhöhte sich die Anzahl an Rif-resistenten Klonen im Vergleich zur Mutationsfrequenz (siehe Abschnitt 4.1.1) um das 22- bis 199-fache. Die Frequenzen Rif-resistenter Klone nach Inkubation mit Donor-DNA variierten von $1,0 \times 10^{-5}$ in der Kombination N6/26695-R1 bis $2,8 \times 10^{-4}$ in der Kombination J99/26695-R1 um einen Mittelwert von $9,1 \times 10^{-5}$ (Abbildung 17).

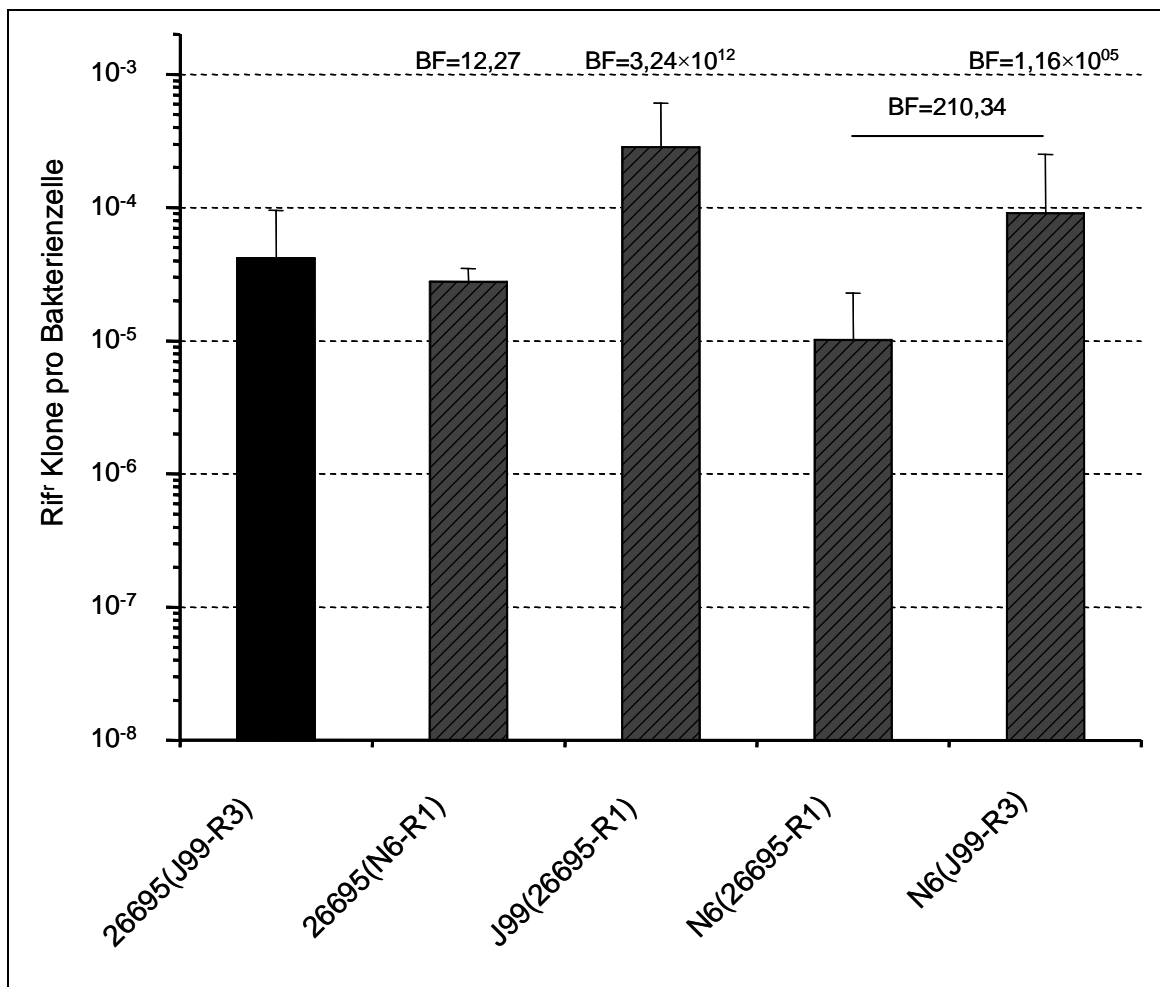


Abbildung 17: Frequenzen Rif-resistenter Klone nach Inkubation mit Donor-DNA

Die Balken stellen die Häufigkeit Rif-resistenter Klone der drei Rezipienten-Stämme 26695, J99 und N6 nach Inkubation mit verschiedenen Donor-DNA dar. In Klammern sind die Donor-Stämme dargestellt. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Der Bayes Faktor (BF) ist für signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kombination 26695/J99-R3 (schwarzer Balken) und zwischen den beiden N6-Kombinationen aufgeführt. Der BF wurde mit Hilfe der Berechnung des Schwarz Kriteriums (BIC) approximiert. ($BF \geq 10$ = stark signifikant, $BF \geq 100$ = entscheidend; Interpretation des BF siehe S. 55) Anzahl der Experimente: 26695(J99-R3): 33, 26695(N6-R1): 4, J99(26695-R1): 6, N6(26695-R1): 4, N6(J99-R3): 18

Die Frequenz Rif-resistenter Klone des Stammes 26695 war signifikant niedriger, wenn er mit N6-R1 transformiert wurde als wenn die Transformation mit J99-R3 Donor-DNA durchgeführt wurde. Ähnliches konnte auch für den Rezipienten N6 gezeigt werden, der DNA des Donor-Stammes J99-R3 neunmal effizienter in sein Genom integrieren konnte als DNA des Stammes 26695-R1. Der Vergleich zweier Versuche, in denen die Transformation in beide Richtungen untersucht wurde, wie hier für die Stämme 26695 und J99 geschehen, zeigte ebenfalls starke Differenzen. Der Stamm J99 konnte DNA des Stammes 26695-R1 siebenmal häufiger in sein Genom einbauen als der Stamm 26695 DNA des Donors J99-R3 (Abbildung

17). Zwischen den Frequenzen Rif-resistenter Zellen der Kombinationen 26695/N6-R1 und N6/26695-R1 konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

4.2.2 Analyse der Länge der DNA-Importe verschiedener Rezipienten/Donor-Kombinationen

Zur Bestimmung der Länge der DNA-Importe in Rif-resistenten Klonen aus den Transformationsexperimenten wurde ein 1663 Bp langes PCR Fragment sequenziert (siehe Abschnitt 3.7) und dieses anschließend mit den Sequenzen des Rezipienten und des Donors verglichen. Die drei Wildtyp-Stämme unterscheiden sich in 3,7-5,5% ihrer Nukleotide im sequenzierten *rpoB*-Fragment, so dass die beiden Sequenzen in relativ regelmäßigen kurzen Abständen über das Fragment verteilt Sequenzunterschiede aufweisen. Dies ermöglichte es, in vielen Fällen die Start- und Endpunkte von Rekombinationsereignissen in dem Fragment mit hoher Genauigkeit zu identifizieren (Abbildung 18 und Abbildung 19). Bei einem Teil der Klone lagen eines oder beide Enden der importierten DNA außerhalb des sequenzierten Bereiches, so dass zur Abschätzung der Länge der Rekombinationsereignisse ein Bayes'sches Modell herangezogen werden musste. Dieses wurde von Dr. Xavier Didelot (Department of Statistics, University of Warwick, Coventry, Großbritannien) innerhalb einer Kooperation mit uns entwickelt. Dabei wurde die Länge der importierten Fragmente für die einzelnen Stammkombinationen mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode (MLE, englisch: „maximum likelihood estimation“) abgeschätzt (siehe Abschnitt 3.11).

Die mittleren Längen der importierten Donor-DNA-Fragmente lagen zwischen 1294 Bp (J99/26695-R1) und 3853 Bp (N6/J99-R3). Dabei waren die DNA-Importe des Rezipienten-Stammes N6 mit über 3800 Bp signifikant länger als die Importe in den beiden anderen Rezipienten-Stämmen. Transformationen der Rezipienten 26695 und N6 mit genomischer DNA zweier unterschiedlicher Donor-Stämme führten zu keinen signifikanten Unterschieden der DNA-Importlängen. Im Stamm 26695 war die mittlere Länge der importierten Fragmente 1681 Bp, wenn die Transformation mit DNA des Rif-resistenten Stammes J99-R3 durchgeführt wurde und 2434 Bp nach der Zugabe von N6-R1 Donor-DNA. Der Unterschied der Importlängen war nicht signifikant. Auch beim Stamm N6 war die Länge der DNA unabhängig von der eingesetzten Donor-DNA. Die Analyse Rif-resistenter Klone des Stammes N6 ergab, dass die mittlere Importlänge nach Inkubation mit 26695-R1-DNA 3819 Bp betrug und die Inkubation mit DNA des Stammes J99-R3 in einer Importlänge von 3853 Bp resultierte (Tabelle 23, Abbildung 18 und Abbildung 19). Die im *in vitro*-Modell

ermittelten Importlängen waren drei- bis neunmal länger als die, durch die Untersuchung sequenzieller Isolate, bestimmten 417 Bp (Falush *et al.*, 2001).

Tabelle 23: Abschätzung der mittleren Importlängen von *H. pylori* Wildtyp-Stämmen mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode

Rezipient	Donor	N ¹	Importlänge ² [Bp]	BF ³
26695	J99-R3	95	1681	
26695	N6-R1	26	2434	0,29
J99	26695-R1	32	1294	0,19
N6	26695-R1	25	3819	28,21
N6	J99-R3	80	3853	4,43×10 ⁴

1: N = Anzahl der analysierten Klone mit DNA-Importen; 2: MLE der Importlängen; 3: BF <3 = nicht signifikant, BF ≥10 = stark signifikant, BF ≥100 =entscheidend; die Berechnung des BF erfolgte in Bezug auf die Kombination 26695/J99-R3; Interpretation des BF siehe S. 55.

Vergleiche der mittleren Länge der DNA-Importe in 5'-Richtung von der Rif-Resistenz vermittelnden Punktmutation des Donors aus gesehen mit den Längen der Importe die in 3'-Richtung lagen, zeigten, dass sich die Importlängen auf beiden Seiten in keiner der analysierten Rezipient/Donor-Kombinationen signifikant voneinander unterschieden (Tabelle 24). Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Integration der Donor-DNA einer geometrischen Verteilung folgt, wodurch das Modell zur Bestimmung der Importlängen gerechtfertigt wird.

Tabelle 24: Länge der DNA-Importe 5'-wärts und 3'-wärts von der Rif-Resistenz vermittelnden Punktmutation des Donors

Rezipient	Donor	N ¹	Importlänge ² [Bp]		BF ³
			5'-wärts	3'-wärts	
26695	J99-R3	95	830	851	0,07
26695	N6-R1	26	1053	1427	0,18
J99	26695-R1	32	669	618	0,13
N6	26695-R1	25	2130	1662	0,16
N6	J99-R3	80	1466	2774	1,09

1: N = Anzahl der analysierten Klone mit DNA-Importen; 2: MLE der Importlängen 5'-wärts bzw. 3'-wärts von der Rif-Resistenz vermittelnden Mutation des Donors; 3: Ein BF <3 stellt keinen signifikanten Unterschied dar. Mit Hilfe des BF wurden die Importlängen beiderseits der Mutation des Donors in den einzelnen Kombinationen verglichen, Interpretation des BF siehe S. 55.

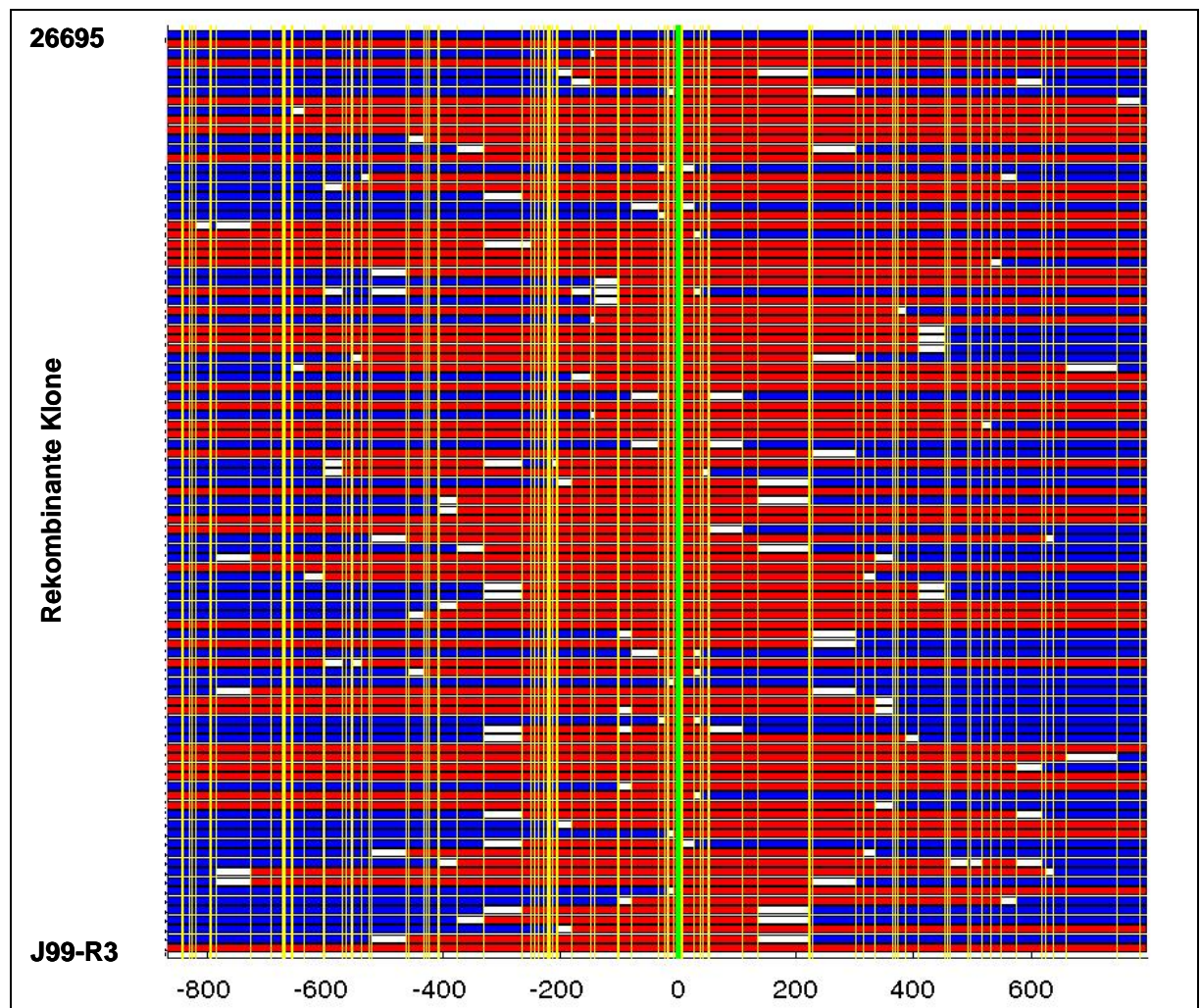


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Sequenz Rif-resistenter Klone des Stammes 26695 nach Transformation mit J99-R3 Donor-DNA

In der Abbildung sind die Sequenzen der einzelnen rekombinanten Klone nach Transformation des Stammes 26695 mit J99-R3 Donor-DNA dargestellt. Jede Reihe repräsentiert die Sequenz eines 1663 Bp langen *rpoB*-Fragments. Die oberste Reihe (blau) stellt die Sequenz des Rezipienten 26695, die unterste Reihe (rot) die Sequenz des Donors J99-R3 dar. Vertikale gelbe Linien zeigen die Polymorphismen zwischen den beiden Stämmen an. Die grüne Linie markiert die Rif-Resistenz vermittelnde Punktmutation des Donors. Die Zahlen unter der Grafik bezeichnen die Position ausgehend von der Rif-Resistenz verleihenden Punktmutation (negative Zahlen 5'-wärts, positive Zahlen 3'-wärts). Die Reihen zwischen den Stämmen 26695 und J99-R3 zeigen die Sequenzen der analysierten Klone. Abschnitte zwischen zwei Nukleotiden an polymorphen Stellen, die identisch mit denen des Donors waren, sind rot, Sequenzabschnitte, die zwischen zwei polymorphen Nukleotiden lagen, die identisch mit der Sequenz des Rezipienten waren, sind blau eingefärbt. Weiß markierte Bereiche zwischen zwei Polymorphismen bezeichnen Abschnitte, bei denen die Herkunft nicht nachgewiesen werden kann.

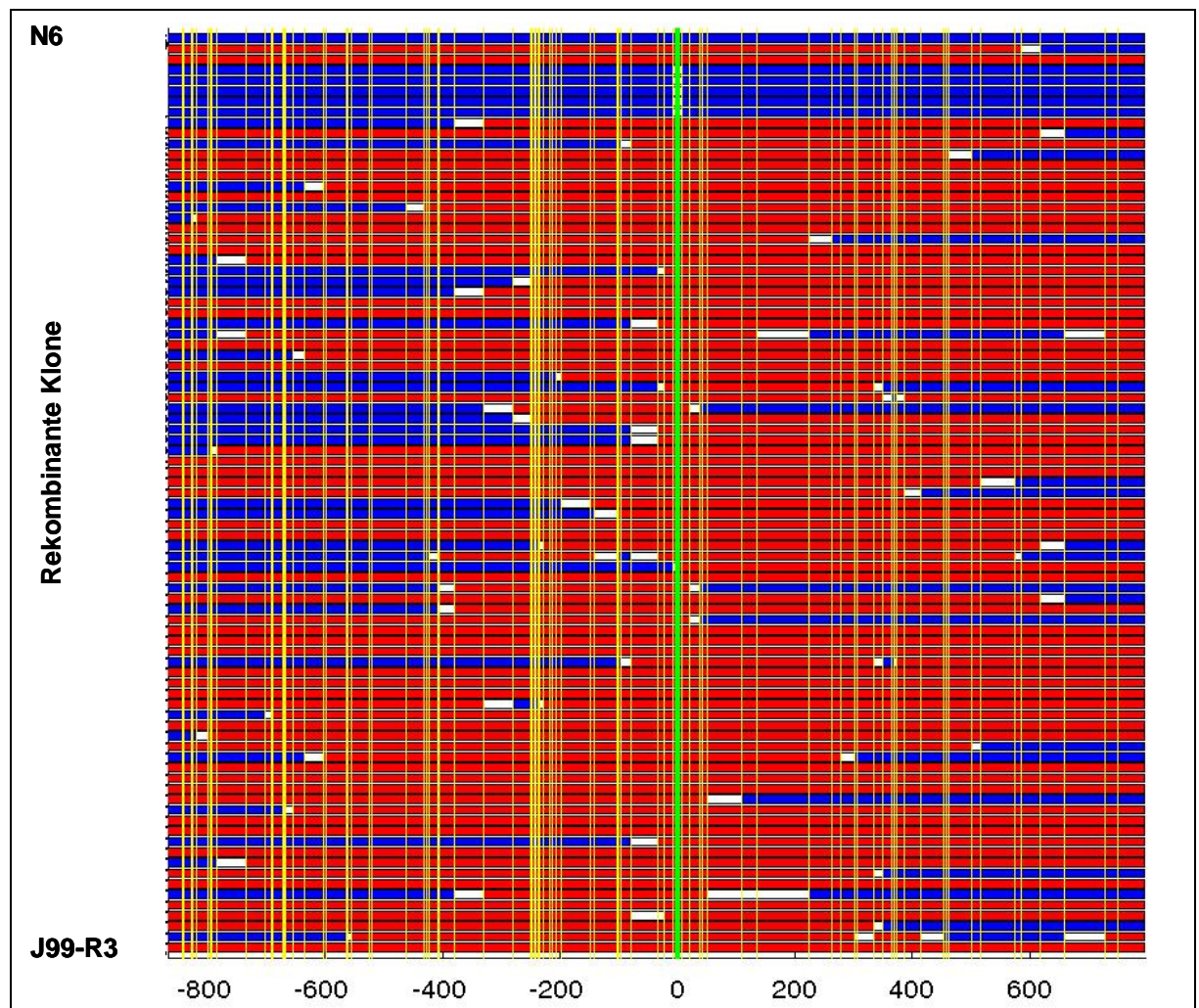


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Sequenz Rif-resistenter Klone des Stammes N6 nach Transformation mit J99-R3 Donor-DNA

Der Farbcode ist in Abbildung 18 erläutert.

4.2.3 Untersuchung der Mosaikstruktur von DNA-Importen

Die Untersuchung der in das Genom integrierten Donor-DNA-Fragmente zeigte, dass bei etwa 10% der Klone der importierte DNA-Abschnitt durch einen oder mehrere Segmente unterbrochen war, welche die Sequenz des Rezipienten aufwiesen (Abbildung 18 und Abbildung 19). Diese Bereiche wurden von uns mit der Abkürzung ISR (englisch: „interspersed sequences of the recipient“) bezeichnet. Einige der ISR umfassten nur ein einzelnes polymorphes Nukleotid, andere beinhalteten bis zu 21 Rezipienten-spezifische Nukleotide und waren bis zu 593 Bp lang. Die mittlere Länge der ISR variierte in den einzelnen Wildtyp-Stämmen zwischen 38 und 121 Bp (Tabelle 25).

Tabelle 25: Anzahl der Klone mit ISR und Abschätzung der ISR-Längen von *H. pylori* Wildtyp-Stämmen

Rezipient	Donor	N ¹	M _{ISR} ²	BF _M ³	Länge der ISR ⁴ [Bp]	BF _{Länge} ³
26695	J99-R3	95	8		39	
26695	N6-R1	26	3	0,19	121	1,20
J99	26695-R1	32	4	0,20	38	0,24
N6	26695-R1	25	5	0,66	110	1,62
N6	J99-R3	80	8	0,12	114	2,26

1: N = Anzahl der analysierten Klone mit DNA-Importen; 2: M_{ISR} = Anzahl der Klone mit ISR; 3: Ein BF <3 stellt keinen signifikanten Unterschied dar. Die Berechnung des BF erfolgte in Bezug auf die Kombination 26695/J99-R3. 4: MLE der ISR-Längen; Interpretation des BF siehe S. 55.

Die Analysen der verschiedenen Transformationskombinationen ergaben, dass acht von 95 Klonen in der Kombination 26695/J99-R3, drei von 26 Klonen in 26695/N6-R1, vier von 32 Klonen in J99/26695-R1, fünf von 25 Klonen in N6/26695-R1 und acht von 80 Klonen in der Kombination N6/J99-R3 ISR aufwiesen (Tabelle 25). Die verschiedenen Rezipienten/Donor-Kombinationen zeigten bezüglich der Länge und der Anzahl an ISR keine signifikanten Unterschiede.

Eine mögliche Ursache für die Entstehung der ISR könnte die Aktivität von Restriktions-Modifikations-Systemen sein. Die Überprüfung dieser Hypothese wurde mit Hilfe statistischer Analysen durch unseren Kooperationspartner Dr. Xavier Didelot durchgeführt. Dabei wurden alle gefundenen ISR genutzt, um einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ISR und den bekannten Erkennungsstellen für Restriktions-Modifikations-Systeme von *H. pylori* zu untersuchen. In die Analysen wurden 36 der bekannten Erkennungsstellen für Restriktions-Modifikations-Systeme von *H. pylori* einbezogen (Tabelle 18) (Lin *et al.*, 2001; Vale und Vitor, 2007; Vitkute *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2000). Es konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Vorkommen dieser Sequenzmotive und den ISR gefunden werden. Dabei bleibt zu berücksichtigen, dass einige Schnittstellen nur selten in dem sequenzierten Fragment vorkommen, so dass eine statistische Analyse dieser Motive nur bedingt möglich war.

4.2.4 Transformation des Wildtyp-Stammes 26695 mit J99-R3 PCR-Produkt

Um zu testen, ob die Unterschiede der Frequenzen Rif-resistenter Klone nach DNA-Zugabe und der Länge der DNA-Importe mit der Methylierung der genomischen DNA zusammenhängen, wurde der Rezipient 26695 zusätzlich zur Transformation mit genomischer

DNA auch mit einem PCR-Produkt des Donor-Stammes J99-R3 im *in vitro*-System transformiert. Für die Transformation wurde ein 2370 Bp großes Fragment des *rpoB*-Gens eingesetzt, welches die Rif-Resistenz vermittelnde Punktmutation des Donors beinhaltet (Abbildung 20). Im Gegensatz zu genomischer DNA sind PCR-Produkte unmethyliert und werden dadurch von Restriktionsendonukleasen als fremd erkannt. Die fehlende Markierung des PCR-Fragments ermöglicht es, den Einfluss der Restriktions-Modifikations-Systeme auf die Rekombination zu analysieren.

Die Frequenz Rif-resistenter Klone nach Zugabe des PCR-Produkts im Rezipienten 26695 betrug $1,4 \times 10^{-5}$ und unterschied sich damit nicht signifikant von der Frequenz nach Transformation mit genomischer DNA. Auch die Länge der DNA-Importe (2468 Bp) und die Anzahl der ISR (zwei Klone mit ISR von 19 sequenzierten Klonen) wichen nicht signifikant von den anderen Werten ab. Allerdings war die Länge der DNA-Importe in 3'-Richtung von der Rif-Resistenz vermittelnden Punktmutation des Donors signifikant länger (MLE der Importlänge = 4700 Bp) als die der Importe in 5'-Richtung von der Punktmutation (MLE der Importlänge = 622 Bp, BF = 333,37), was sehr wahrscheinlich auf die Asymmetrie des verwendeten PCR-Produktes zurückzuführen war (Abbildung 20).

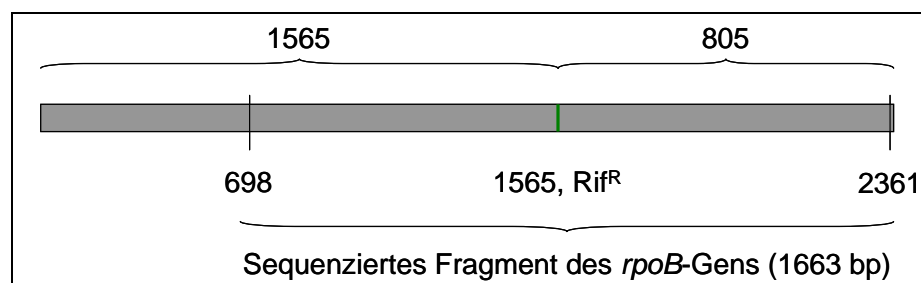


Abbildung 20: PCR-Produkt des J99-R3 *rpoB*-Gens zur Transformation des Stammes 26695

Der graue Balken repräsentiert das aus dem Donor-Stamm J99-R3 amplifizierte 2370 Bp große PCR-Fragment des *rpoB*-Gens. Die grüne Linie markiert die Rif-Resistenz vermittelnde Punktmutation des Donors an Position 1565 des Fragments. 1565 Bp des Fragments liegen 3'-wärts und 805 Bp 5'-wärts ausgehend von der Punktmutation. Der sequenzierte Bereich umfasst die Nukleotide von Position 698 bis 2361.

4.3 Untersuchung des Einflusses des DNA-Aufnahmesystems auf die Mutationsfrequenz und Rekombination von *H. pylori* *in vitro*

4.3.1 Frequenzen Rif-resistenter Klone mit und ohne Zugabe von Donor-DNA

Freie genomische DNA wird in *H. pylori* durch das ComB-DNA-Aufnahmesystem in die Zellen transportiert. Um zu untersuchen, ob dieses System die Länge der importierten DNA reguliert oder an der Entstehung von ISR beteiligt ist, wurde eine Mutante mit einem inaktivierten *comB10*-Gen konstruiert. Das Gen kodiert für das Strukturprotein ComB10 (Hofreuter *et al.*, 2003; Terradot *et al.*, 2005) des Aufnahmesystems und wurde als essentiell für die DNA-Aufnahme charakterisiert (Hofreuter *et al.*, 2001). Das *comB10*-Gen wurde durch die Insertion der Kanamycin-Resistenz-Kassette *aphA3'*-III und der Deletion von 25 Nukleotiden im Zentrum des Gens inaktiviert, so dass kein funktionelles ComB10-Protein mehr gebildet werden konnte (siehe Abschnitt 3.4 und Abbildung 6).

Die Untersuchung des Stammes 26695*comB10* im *in vitro*-Transformationssystem zeigte, dass sich die Mutationsfrequenz der Mutante nicht von der des Wildtyp-Stammes unterschied (Tabelle 26). Durch die Inkubation der Mutante mit genomischer DNA des Donor-Stammes J99-R3 wurde die Anzahl Rif-resistenter Kolonien im Vergleich zu der Anzahl an Rif-resistenten Spontanmutanten nicht erhöht. Die Sequenzierung der Klone zeigte, dass alle eine Punktmutation im *rpoB*-Gen trugen, die der Grund für die Rif-Resistenz war. Keiner der untersuchten Klone hatte DNA des Donors in das *rpoB*-Gen integriert.

Tabelle 26: Mutations- und Rekombinationsfrequenzen der 26695*comB10*-Mutante

Rezipient	Donor	Mutationsfrequenz			Rekombinationsfrequenz		
		Mittel	Std ¹	BF ²	Mittel	Std ¹	BF ²
26695	J99-R3	$1,14 \times 10^{-06}$	$4,95 \times 10^{-07}$		$4,17 \times 10^{-05}$	$5,37 \times 10^{-05}$	
26695 ³	J99-R3EP	$2,70 \times 10^{-07}$	-	-	$3,21 \times 10^{-05}$	$2,88 \times 10^{-05}$	0,08
26695 <i>comB10</i>	J99-R3	$1,23 \times 10^{-06}$	$1,15 \times 10^{-06}$	0,61	$<10^{-08}$		$1,97 \times 10^{-06}$
26695 <i>comB10</i>	J99-R3EP	$9,95 \times 10^{-07}$	$1,95 \times 10^{-07}$	0,08	$1,40 \times 10^{-05}$	$1,52 \times 10^{-05}$	1,01

1: Standardabweichung; 2: BF <3 = nicht signifikant, BF ≥10 = stark signifikant, BF ≥100 = entscheidend; die Berechnung des BF erfolgte in Bezug auf die Kombination 26695/J99-R3; Interpretation des BF siehe S. 55. 3: Die Mutationsfrequenz wurde nur in einem Experiment bestimmt, so dass keine Berechnung der Standardabweichung und des BF möglich war.

4.3.2 Umgehung des DNA-Aufnahmesystems durch die Einbringung von Donor-DNA mittels Elektroporation

Da die DNA des Donor-Stammes in der *comB10*-Mutante durch das defekte Aufnahmesystem nicht aus der Umgebung in die Bakterienzelle gelangen konnte, musste zur Untersuchung des Einflusses der DNA-Aufnahme auf die Importlänge und der Bildung von ISR das System umgangen werden. Dazu wurde die DNA mit Hilfe der Elektroporationsmethode (siehe Abschnitt 3.6) in die Bakterienzellen gebracht.

Die Elektroporation von Bakterienzellen ohne die Zugabe von DNA zeigte, dass die Methode keinen signifikanten Einfluss auf die Häufigkeit Rif-Resistenz vermittelnder Mutationen im *rpoB*-Gen (BF = 0,08) hatte. Die Elektroporation mit Donor-DNA führte hingegen zu einem starken Anstieg der Anzahl resistenter Klone ($1,4 \times 10^{-5}$) im Rezipienten-Stamm 26695*comB10*, die sich nicht signifikant von Anzahl Rif-resistenter Klone des Wildtyp-Stammes 26695 nach natürlicher Transformation und nach Elektroporation unterschied (Tabelle 26). Die Analyse der Klone ergab, dass die mittlere DNA-Importlänge von rekombinanten Klonen nach Elektroporation mit 2228 Bp nicht signifikant von der des Wildtyp-Stammes nach natürlicher Transformation abwich. Die Anzahl an ISR innerhalb der untersuchten Sequenzen mit Import elektroporierter Klone des Stammes 26695*comB10* war signifikant erhöht (BF = 11,45). Um die Auswirkung der Elektroporation zu überprüfen, wurden 32 Klone aus einer Elektroporation des Stammes 26695 untersucht, die ein Fragment der Donor-DNA importiert hatten. Auch im Wildtyp hatte die Elektroporation keinen signifikanten Einfluss auf die Länge der DNA-Importe; die Anzahl an ISR in den analysierten Sequenzen war im Gegensatz zur *comB10*-Mutante nicht höher als die Anzahl der ISR in Klonen aus der natürlichen Transformation des Stammes.

Tabelle 27: Importlänge und Bildung von ISR in der 26695*comB10*-Mutante nach natürlicher Transformation bzw. Elektroporation mit J99-R3 Donor-DNA

Rezipient	N ¹	Importlänge ² [Bp]	BF ³	M _{ISR} ⁴	BF ³
26695	95	1681		8	
26695 EP	32	1093	0,16	5	0,31
26695 <i>comB10</i>	0	–	–	0	–
26695 <i>comB10</i> EP ⁵	25	2228	0,15	8	11,45

Alle Transformationen wurden mit genomischer DNA des Stammes J99-R3 durchgeführt. 1: N = Anzahl der analysierten Klone mit DNA-Importen; 2: MLE der Importlängen; 3: BF <3 = nicht signifikant, BF ≥10 = stark signifikant, die Berechnung des BF erfolgte in Bezug auf die Kombination 26695/J99-R3; Interpretation des BF siehe siehe S. 55. 4: M_{ISR} = Anzahl der Klone mit ISR; 5: EP: elektroporiert

4.4 Untersuchung der Auswirkung von Gen-Inaktivierungen der DNA-Reparatur- und Rekombinationsmechanismen von *H. pylori* im *in vitro*-Transformationssystem

Da die Analysen der 26695*comB10*-Mutante ergaben, dass die DNA-Aufnahme über das ComB-System weder für die Länge der DNA-Importe noch für die Entstehung von ISR verantwortlich war, wurde als nächstes die Hypothese geprüft, dass die Importlänge und/oder die Entstehung von ISR durch Gene der DNA-Reparatur- und Rekombinationssysteme bestimmt werden könnten. Um dieses überprüfen zu können, wurden Einzelgen-Mutanten der Glykosylasen *mutY*, *nth* und *ung*, der DNA-Endonuklease *xth*, der Rekombinase *recA*, des *recB*-Homologs HP1553, der DNA-Helikasen *recG*, *recN*, *recR* sowie der beiden Einzelstrang-DNA spezifischen Exonukleasen *recJ* und *xseA* hergestellt und die Auswirkung der Inaktivierungen im *in vitro*-Transformationssystem untersucht. Zusätzlich zu den Einzelgenmutanten wurde auch eine Doppelmutante der Gene *recJ* und *xseA* konstruiert und analysiert.

Die Untersuchung im Transformationssystem wurde vorwiegend mit Mutanten des *H. pylori*-Stammes 26695 durchgeführt. Analog zu den Wildtyp-Stämmen wurden die einzelnen Mutanten im Transformationssystem analysiert und charakterisiert (Abbildung 16). Die eingesetzte Donor-DNA stammte aus dem Stamm J99-R3.

4.4.1 Untersuchung der Rekombinase RecA

Das RecA-Protein spielt eine zentrale Rolle in der Rekombination von Bakterien (Cox, 2003). Auch für *H. pylori* wurde die Wichtigkeit des Enzyms bei der Rekombination und der Reparatur von geschädigter DNA beschrieben (Fischer und Haas, 2004; Schmitt *et al.*, 1995; Thompson und Blaser, 1995). Um die Auswirkung einer *recA*-Inaktivierung in unserem *in vitro*-Transformationssystem zu untersuchen, wurde die Mutante 26695*recA* konstruiert und charakterisiert. Die Inaktivierung von *recA* beeinflusste sowohl die Mutationsfrequenz als auch die Rekombination. So war die Frequenz Rif-resistenter Spontanmutanten im Vergleich zum 26695 Wildtyp-Stamm um das 16-fache reduziert ($7,0 \times 10^{-8}$, BF = 31,37). Die Zugabe von Donor-DNA des Rif-resistenten Stammes J99-R3 erhöhte die Anzahl Rif-resistenter 26695*recA*-Klone nicht und die Sequenzierung ergab, dass sämtliche Klone Ergebnisse von Rif-Resistenz vermittelnden Spontanmutationen waren (Tabelle 28).

Tabelle 28: Mutations- und Rekombinationsfrequenzen der 26695*recA*-Mutante

Recipient	Donor	Mutationsfrequenz			Transformationsfrequenz		
		Mittel	Std ¹	BF ²	Mittel	Std	BF ²
26695	J99-R3	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,95 \times 10^{-7}$		$4,17 \times 10^{-5}$	$5,37 \times 10^{-5}$	
26695 <i>recA</i>	J99-R3	$7,00 \times 10^{-8}$	$7,00 \times 10^{-8}$	31,37	$< 10^{-8}$		$2,99 \times 10^{09}$

1: Standardabweichung; 2: BF <3 = nicht signifikant, BF ≥10 = stark signifikant, BF ≥100 = entscheidend; die Berechnung des BF erfolgte in Bezug auf die Kombination 26695/J99-R3; Interpretation des BF siehe S. 55.

4.4.2 Untersuchung des RecB-Homologs HP1553

In *E. coli* leitet der RecBCD-Weg die Reparatur von Doppelstrangbrüchen in der DNA ein (Kuzminov, 1999) und stellt damit einen wichtigen Mechanismus zum Schutz der Bakterien dar. Die Reparatur kann nur stattfinden, wenn alle drei Enzyme sowie ATP vorhanden sind (Taylor und Smith, 1995; Taylor und Smith, 2003). Obwohl in *H. pylori* weder ein *recC*- noch ein *recD*-Homolog vorhanden sind, konnte innerhalb dieser Arbeit das Gen HP1553 als potenzielles *recB*-Homolog identifiziert werden. Dazu wurde das Genprodukt mit Hilfe des Programms zum Suchen von konservierten Domänen („CDS“, National Center for Biotechnology Information) sowie „BLASTP“ (National Center for Biotechnology Information) mit Proteinen von *E. coli* verglichen (Altschul *et al.*, 1997; Altschul *et al.*, 2005; Marchler-Bauer *et al.*, 2005). Das von HP1553 kodierte Protein (945 Aminosäuren) zeigte

24% Identität zur RecB-Sequenz von *E. coli* K-12 in den ersten 437 Aminosäuren und 25 % Identität im Bereich der Aminosäuren 638-740.

Die Inaktivierung des *recB*-Gens im Stamm 26695 führte zu einer um 88% niedrigeren Frequenz Rif-resistenter Spontanmutanten im Vergleich zum Wildtyp-Stamm (Abbildung 21). Auch die durch Rekombination hervorgerufene Rif-Resistenz nach der Transformation mit J99-R3 Donor-DNA war um 97% niedriger ($1,3 \times 10^{-6}$ resistente Klone pro Zelle, $BF = 8,02 \times 10^7$) als im Stamm 26695 (Abbildung 22).

Die importierten DNA-Fragmente hatten eine mittlere Länge von 2621 Bp und wiesen sieben ISR mit einer mittleren Länge von 85 Bp auf (Tabelle 29). Weder die Importlänge noch die Zahl der ISR unterschieden sich signifikant von denen des Wildtyp-Stammes.

Tabelle 29: Importlänge und ISR des Stammes 26695*recB* nach Transformation mit J99-R3

Rezipient	N ¹	Importlänge ² [Bp]	BF _{Import} ³	M _{ISR} ⁴	BF _M ³	Länge der ISR ⁵ [Bp]	BF _{Länge} ³
26695	95	1681		8		39	
26695 <i>recB</i>	51	2621	2,00	7	0,22	85	0,76

Die Transformationen wurden mit genomischer DNA des Stammes J99-R3 durchgeführt. 1: N = Anzahl der analysierten Klone mit DNA-Importen; 2: MLE der Importlängen; 3: Ein $BF < 3$ stellt keinen signifikanten Unterschied dar. Die Berechnung des BF erfolgte in Bezug auf die Kombination 26695/J99-R3; Interpretation des BF siehe S. 55. 4: M_{ISR} = Anzahl der Klone mit ISR; 5: MLE der ISR-Längen

4.4.3 Untersuchung der Helikase RecG

Die Helikase RecG ist in *E. coli* an der Migration und Auflösung von Holliday-Strukturen (McGlynn und Lloyd, 1999) sowie der rekombinativen Reparatur von DNA-Läsionen während der Replikation beteiligt (McGlynn und Lloyd, 2002). Für *H. pylori* wurde gezeigt, dass *recG* nicht für die Reparatur durch Rekombination genutzt wird und dass es durch die Inaktivierung zu einem Anstieg der Rekombinationsfrequenz kommt (Kang *et al.*, 2004). Um zu überprüfen, ob die Inaktivierung des *recG*-Gens zusätzlich zur Erhöhung der Rekombinationsfrequenz auch zu einer Veränderung der DNA-Importe führt, wurde eine 26695*recG*-Mutante im Transformationssystem untersucht. Die Inaktivierung des Gens hatte keine signifikante Auswirkung auf die Mutationsfrequenz der Mutante ($6,3 \times 10^{-7}$; $BF = 0,18$; Abbildung 21). Im Gegensatz dazu war die Frequenz Rif-resistenter Klone nach der Transformation mit Donor-DNA im Vergleich zum Wildtyp-Stamm um das Vierfache erhöht ($1,6 \times 10^{-4}$; $BF = 1912$; Abbildung 22). Die Inaktivierung des Gens hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Länge der DNA-Importe oder die Häufigkeit des Auftretens von ISR (Tabelle 30).

Tabelle 30: Importlänge und ISR des Stammes 26695*recG* nach Transformation mit J99-R3

Rezipient	N ¹	Importlänge ² [Bp]	BF _{Import} ³	M _{ISR} ⁴	BF _M ³	Länge der ISR ⁵ [Bp]	BF _{Länge} ³
26695	95	1681		8		39	
26695 <i>recG</i>	63	1912	0,08	8	0,18	62	0,36

Die Transformationen wurden mit genomischer DNA des Stammes J99-R3 durchgeführt. 1: N = Anzahl der analysierten Klone mit DNA-Importen; 2: MLE der Importlängen; 3: Ein BF <3 stellt keinen signifikanten Unterschied dar. Die Berechnung des BF erfolgte in Bezug auf die Kombination 26695/J99-R3; Interpretation des BF siehe S. 55. 4: M_{ISR} = Anzahl der Klone mit ISR; 5: MLE der ISR-Längen

4.4.4 Untersuchung der Exonukleasen RecJ und ExoVII

Untersuchungen der vier ssDNA-Exonukleasen RecJ, ExoI, ExoVII und ExoX von *E. coli* haben gezeigt, dass diese wichtige Funktionen in der Rekombination und der methylgerichteten Reparatur von DNA erfüllen (Chase und Richardson, 1977; Cooper *et al.*, 1993; Viswanathan und Lovett, 1998). In *H. pylori* sind nur zwei wahrscheinliche ssDNA-Exonukleasen gefunden worden, RecJ und ExoVII, deren Funktionen jedoch in *H. pylori* bisher nicht genauer untersucht wurden.

Für die Charakterisierung der beiden *H. pylori*-Exonukleasen wurden das *recJ*-Gen sowie das für die große Untereinheit der Exonuklease VII kodierende Gen *xseA* durch die Unterbrechung mit einer Resistenzkassette inaktiviert. Im *in vitro*-Transformationssystem wurden sowohl die beiden Einzelgenmutanten im *H. pylori*-Stamm 26695 als auch eine Mutante, in der beide Gene inaktiviert waren, untersucht. Die Inaktivierung des *recJ*-Gens hatte weder eine Veränderung der Mutationsfrequenz noch eine Veränderung der Frequenz Rif-resistenter Klone nach Inkubation mit Donor-DNA zur Folge (Abbildung 21 und Abbildung 22). Dagegen zeigte die 26695*xseA*-Mutante eine signifikante 23-fache Erhöhung der Frequenz Rif-resistenter Klone durch Rekombination ($9,7 \times 10^{-4}$; BF = $1,01 \times 10^{26}$; Abbildung 22) bei einer im Vergleich zum Wildtyp unveränderten Mutationsfrequenz. Auch die *recJxseA*-Doppelmutante wies eine erhöhte Frequenz Rif-resistenter Klone nach der Transformation mit Donor-DNA auf ($1,3 \times 10^{-4}$; BF = 28,80). Keine der zwei untersuchten ssDNA-Exonukleasen hatte einen Effekt auf die Länge der importierten Donor-DNA-Fragmente oder die Durchsetzung der Importe mit ISR (Tabelle 31).

Tabelle 31: Importlänge und ISR in den Einzelgenmutanten 26695*recJ*, 26695*xseA* und der Doppelmutante 26695*recJxseA* nach Transformation mit J99-R3

Rezipient	N ¹	Importlänge ² [Bp]	BF _{Import} ³	M _{ISR} ⁴	BF _M ³	Länge der ISR ⁵ [Bp]	BF _{Länge} ³
26695	95	1681		8		39	
26695 <i>recJ</i>	61	1989	0,11	8	0,20	78	0,61
26695 <i>xseA</i>	59	1938	0,10	11	0,75	78	0,65
26695 <i>recJxseA</i>	55	2348	0,50	8	0,26	43	0,25

Die Transformationen wurden mit genomischer DNA des Stammes J99-R3 durchgeführt. 1: N = Anzahl der analysierten Klone mit DNA-Importen; 2: MLE der Importlängen; 3: Ein BF <3 stellt keinen signifikanten Unterschied dar. Die Berechnung des BF erfolgte in Bezug auf die Kombination 26695/J99-R3; Interpretation des BF siehe S. 55. 4: M_{ISR} = Anzahl der Klone mit ISR; 5: MLE der ISR-Längen

4.4.5 Untersuchung der Gene *recN* und *recR*

Die beiden Enzyme RecN und RecR stellen in den Modellorganismen *E. coli* und *B. subtilis* wichtige Komponenten von Systemen zur rekombinativen Reparatur dar. RecR ist zusammen mit RecF und RecO an der Reparatur von Einzelstrangbrüchen beteiligt (Kuzminov, 1999) während RecN eine Beteiligung an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zugesprochen wird (Kidane *et al.*, 2004; Meddows *et al.*, 2005).

Die Inaktivierung der Gene *recN* und *recR* in *H. pylori* hatte keine signifikanten Veränderungen der Mutationsfrequenzen im Vergleich zum isogenen Wildtyp-Stamm 26695 zur Folge (Abbildung 21). Beide Gen-Mutationen hatten aber einen starken Einfluss auf die Rekombination in *H. pylori*. 26695-Mutanten, denen das RecN-Protein fehlte, wiesen eine um 91% niedrigere Frequenz Rif-resistenter Klone nach Inkubation mit J99-R3 Donor-DNA auf ($3,9 \times 10^{-6}$; BF = $1,58 \times 10^8$; Abbildung 22) als der Wildtyp-Stamm. Einen gegenteiligen Effekt hatte die Inaktivierung des *recR*-Gens. 26695*recR*-Mutanten hatten eine achtfach höhere Frequenz Rif-resistenter Klone nach der Transformation mit Donor-DNA ($3,5 \times 10^{-4}$; BF = $1,52 \times 10^{11}$) als der Stamm 26695 (Abbildung 22). In Bezug auf die Länge der importierten DNA und die Anzahl an ISR gab es keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp (Tabelle 32). Allerdings war die mittlere Länge der ISR im Stamm 26695*recR* mit 170 Bp signifikant erhöht im Vergleich zu den im Mittel 39 Bp langen ISR des Stammes 26695.

Tabelle 32: Importlänge und ISR der Stämme 26695*recN* und 26695*recR* nach Transformation mit J99-R3

Rezipient	N ¹	Importlänge ² [Bp]	BF _{Import} ³	M _{ISR} ⁴	BF _M ³	Länge der ISR ⁵ [Bp]	BF _{Länge} ³
26695	95	1681		8		39	
26695 <i>recN</i>	59	2255	0,33	2	0,20	15	0,45
26695 <i>recR</i>	69	2026	0,12	6	0,11	170	10,27

Die Transformationen wurden mit genomischer DNA des Stammes J99-R3 durchgeführt. 1: N = Anzahl der analysierten Klone mit DNA-Importen; 2: MLE der Importlängen; 3: BF <3 = nicht signifikant, BF ≥10 = stark signifikant, die Berechnung des BF erfolgte in Bezug auf die Kombination 26695/J99-R3; Interpretation des BF siehe S. 55. 4: M_{ISR} = Anzahl der Klone mit ISR; 5: MLE der ISR-Längen

4.4.6 Untersuchung der Glykosylasen Ung und Nth sowie der Endonuklease Xth

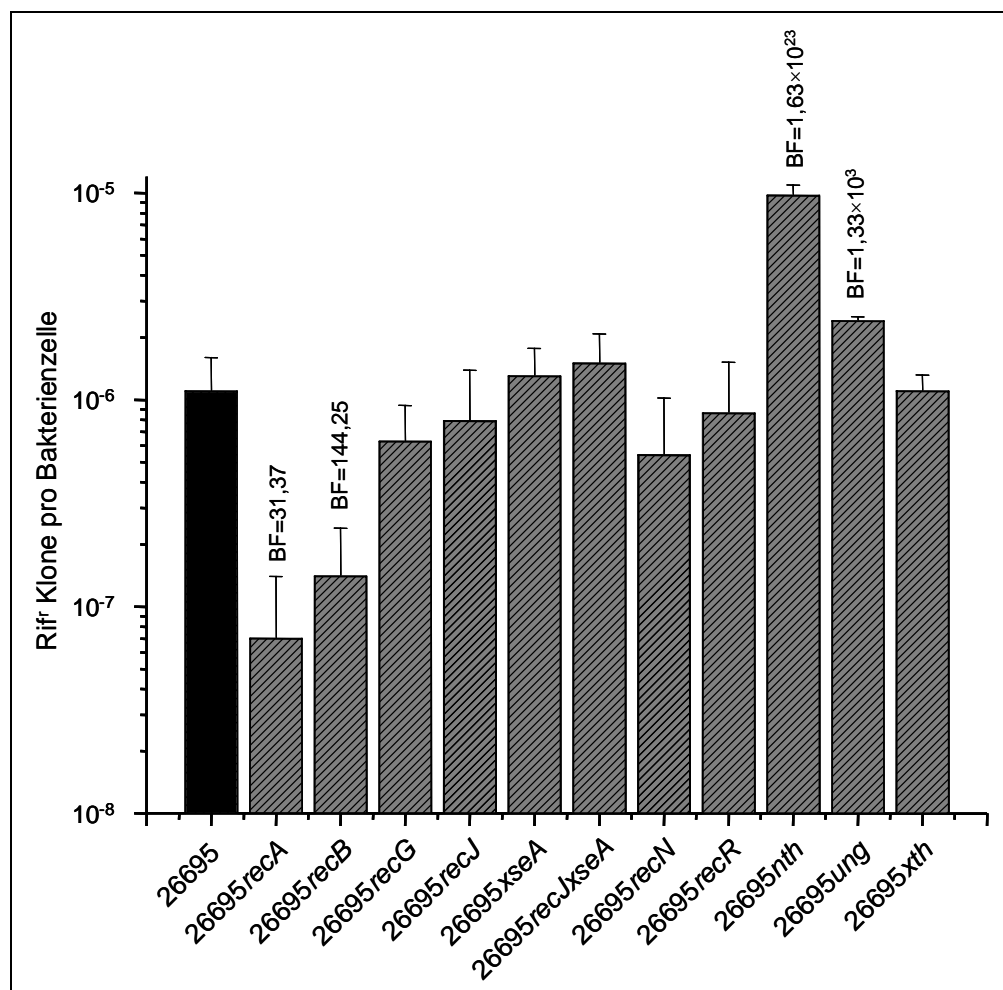
Die Basen-Exzisions-Reparatur stellt einen wichtigen Mechanismus zur Verhinderung von Mutationen dar. Für die Exzision werden Glykosylasen, welche die N-glykosidische Bindung zwischen der beschädigten Base und der Desoxyribose hydrolysieren, sowie Endonukleasen, die die entstandene AP-Stelle entfernen, benötigt. Im Folgenden sind die Analysen der Glykosylasen Ung und Nth sowie der AP-Endonuklease Xth beschrieben. Auf Grund der besonderen Stellung der Glykosylase MutY in *H. pylori* sind die Untersuchungen der Rekombination von *mutY*-Mutanten in Abschnitt 4.4.7 gesondert aufgeführt.

Die Inaktivierung des Endonuklease-Gens *xth* hatte keinen Effekt auf die im *in vitro*-Transformationssystem untersuchten Parameter (Abbildung 21 und Abbildung 22, Tabelle 33). In den beiden anderen 26695-Mutanten kam es im Vergleich zum Wildtyp zu einem signifikanten Anstieg der Mutationshäufigkeiten. Der Stamm 26695*nth* zeigte eine neunfache Erhöhung ($9,7 \times 10^{-6}$; BF = $1,63 \times 10^{23}$) und der Stamm 26695*ung* eine Verdoppelung ($2,4 \times 10^{-6}$; BF = 1327) der Mutationshäufigkeit (Abbildung 21). Zusätzlich führte die Unterbrechung des *nth*-Gens zu einem Anstieg der Frequenz Rif-resistenter Klone pro Bakterienzelle um das Fünffache auf $2,2 \times 10^{-4}$ (BF = $4,06 \times 10^5$; Abbildung 22). Die Länge der importierten DNA unterschied sich mit 1919 Bp im Stamm 26695*nth* und 2390 Bp in der *ung*-Mutante nicht signifikant vom 26695 Wildtyp-Stamm. Auch auf die Anzahl und Länge der ISR hatte die Inaktivierung der Gene *ung* und *nth* keine Auswirkung (Tabelle 33).

Tabelle 33: Importlänge und ISR der Stämme 26695^{nth}, 26695^{ung} und 26695^{xth} nach Transformation mit J99-R3

Rezipient	N ¹	Importlänge ² [Bp]	BF _{Import} ³	M _{ISR} ⁴	BF _M ³	Länge der ISR ⁵ [Bp]	BF _{Länge} ³
26695	95	1681		8		39	
26695 ^{nth}	53	1919	0,08	9	0,45	87	0,89
26695 ^{ung}	56	2390	0,60	7	0,18	55	0,31
26695 ^{xth}	33	1696	0,06	4	0,19	113	1,39

Die Transformationen wurden mit genomischer DNA des Stammes J99-R3 durchgeführt. 1: N = Anzahl der analysierten Klone mit DNA-Importen; 2: MLE der Importlängen; 3: Ein BF <3 stellt keinen signifikanten Unterschied dar. Die Berechnung des BF erfolgte in Bezug auf die Kombination 26695/J99-R3; Interpretation des BF siehe S. 55. 4: M_{ISR} = Anzahl der Klone mit ISR; 5: MLE der ISR-Längen

**Abbildung 21: Mutationsfrequenzen der 26695-Mutanten**

In der Abbildung sind die Mutationsfrequenzen für den Wildtyp-Stamm 26695 sowie zehn isogene Mutanten und eine Doppelmutante verschiedener Gene der DNA-Reparatur- und Rekombinationssysteme von *H. pylori* mit Standardabweichungen dargestellt. Für Mutanten, die einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp aufwiesen, ist der BF mit aufgeführt. (BF ≥ 30 = sehr stark signifikant, BF ≥ 100 = entscheidend; Interpretation des BF siehe S. 55) Anzahl der Experimente: 26695: 35, 26695recA: 2, 26695recB: 3, 26695recG: 3, 26695recJ: 4, 26695xseA: 3, 26695recJxseA: 3, 26695recN: 7, 26695recR: 3, 26695nth: 3, 26695ung: 3, 26695xth: 3

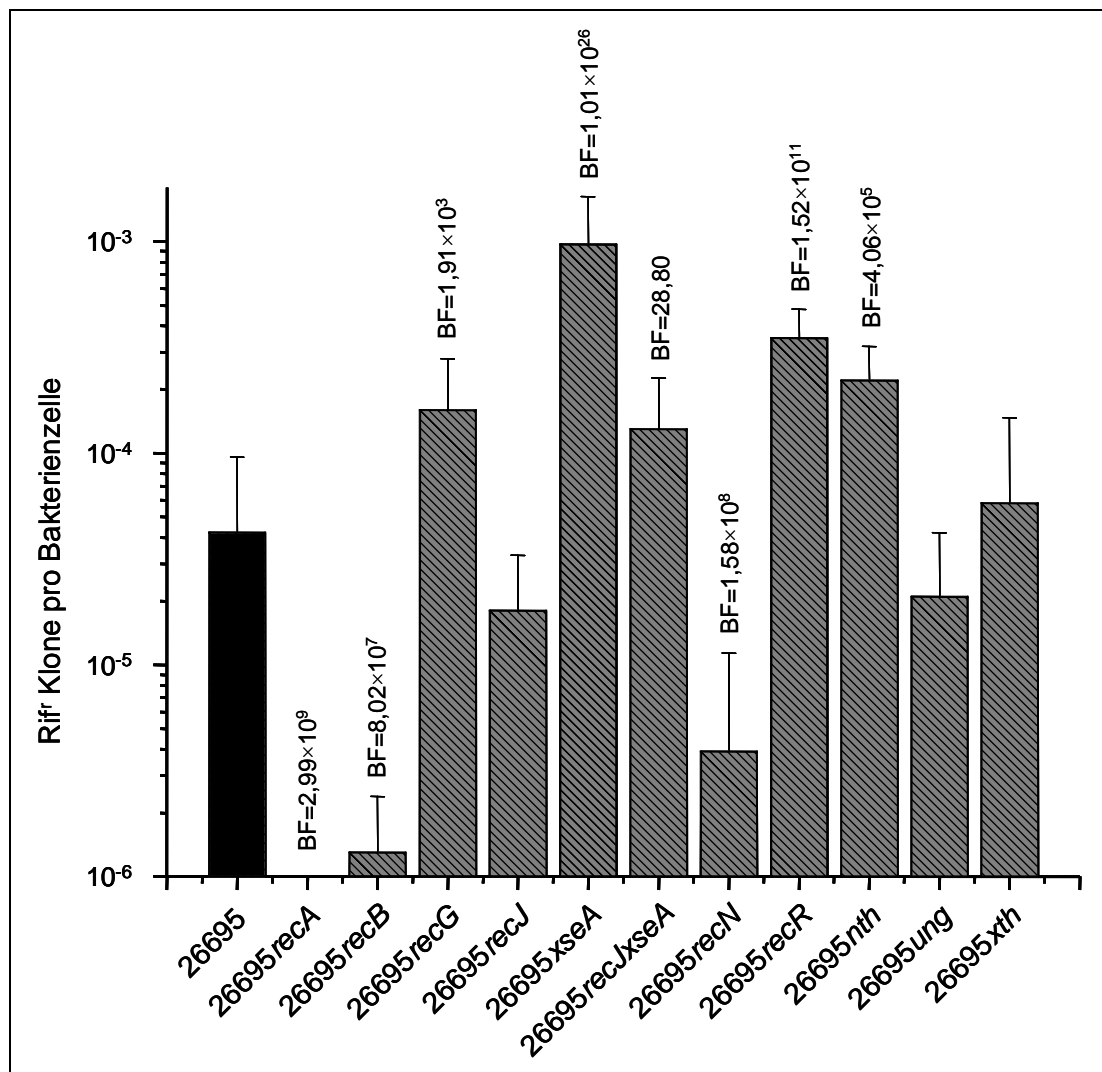


Abbildung 22: Frequenzen Rif-resistenter Klone der 26695-Mutanten nach Inkubation mit J99-R3 Donor-DNA

In der Abbildung sind die Frequenzen des Wildtyp-Stammes 26695 sowie zehn isogener Mutanten und einer Doppelmutante in verschiedenen Genen der DNA-Reparatur- und Rekombinationssysteme von *H. pylori* nach Inkubation mit J99-R3 Donor-DNA mit Standardabweichungen dargestellt. Die angegebenen BF-Werte beziehen sich auf die Referenz-Kombination 26695/J99-R3 und sind nur für signifikante Abweichungen dargestellt. (BF ≥ 10 = stark signifikant, BF ≥ 100 = entscheidend; Interpretation des BF siehe S. 55) Anzahl der Experimente: 26695: 33, 26695recA: 4, 26695recB: 6, 26695recG: 6, 26695recJ: 6, 26695xseA: 5, 26695recJxseA: 6, 26695recN: 14, 26695recR: 6, 26695nth: 6, 26695ung: 6, 26695xth: 5

4.4.7 Analyse der Rekombination in *mutY*-Mutanten

Da die Auswirkung einer Inaktivierung des *mutY*-Gens auf die Mutationsfrequenz von *H. pylori* schon ausführlich im Abschnitt 4.1 beschrieben wurde, wird in diesem Abschnitt ausschließlich auf das Verhalten der *mutY*-Mutante nach der Inkubation mit Donor-DNA eingegangen.

Untersuchungen der Stämme 26695*mutY* und N6*mutY* nach der Inkubation mit J99-R3 Donor-DNA im *in vitro*-System zeigten, dass die Inaktivierung der Glykosylase keine Auswirkung auf die Frequenz Rif-resistenter Klone nach der Inkubation mit Donor-DNA in den beiden Stämmen hatte. Die Frequenz des Stammes 26695*mutY* betrug $4,6 \times 10^{-5}$ Rif-resistente Klone pro Bakterienzelle und die des Stammes N6*mutY* $6,8 \times 10^{-5}$. Damit unterschieden sich die Frequenzen nicht signifikant von denen der dazugehörigen Wildtyp-Stämme.

Auch ein möglicher Einfluss der MutY-Glykosylase auf die Länge der importierten DNA sollte untersucht werden. Dazu war es notwendig, Rif-resistente Klone des Stammes 26695*mutY* nach Transformation mit J99-R3 Donor-DNA vor der Sequenzierung auf DNA-Importe zu überprüfen, da durch die gesteigerte Mutationsfrequenz des Stammes der Hintergrund an Spontanmutanten sehr hoch war. Diese Vorauswahl der Klone wurde mit Hilfe einer allelspezifischen PCR durchgeführt, die auf die Rif-Resistenz vermittelnde Mutation des Donor-Stammes J99-R3 (Position 1618 A zu T) selektierte. 43 der 250 analysierten Klone hatten ihre Rif-Resistenz durch die Rekombination von Donor-DNA erlangt und konnten zur Sequenzierung des *rpoB*-Fragments verwendet werden (Abbildung 23).

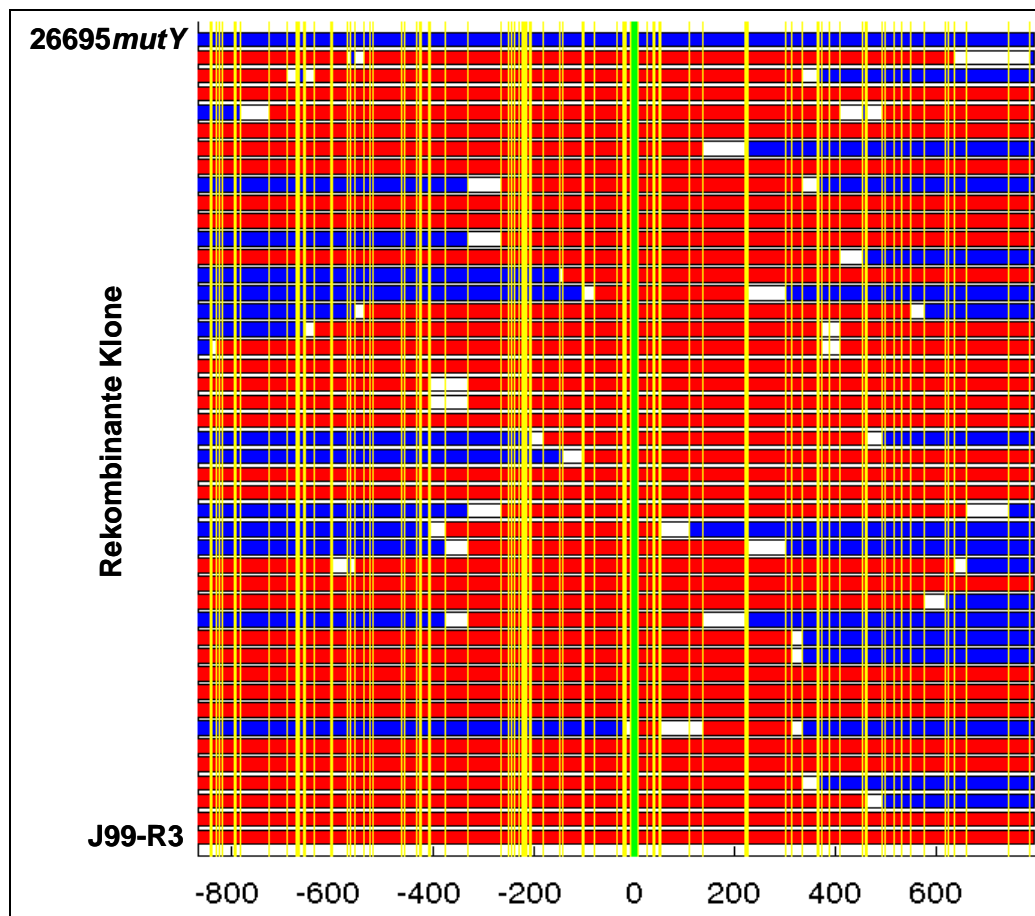


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Sequenz Rif-resistenter Klone des Stammes 26695*mutY* nach Transformation mit J99-R3 Donor-DNA

In der Abbildung sind die Sequenzen der einzelnen rekombinanten Klone nach Transformation des Stammes 26695*mutY* mit J99-R3 Donor-DNA dargestellt. Jede Reihe repräsentiert die Sequenz eines 1663 Bp langen *rpoB*-Fragments. Die oberste Reihe (blau) stellt die Sequenz des Rezipienten 26695*mutY*, die unterste Reihe (rot) die Sequenz des Donors J99-R3 dar. Vertikale gelbe Linien zeigen die Polymorphismen zwischen den beiden Stämmen an. Die grüne Linie markiert die Rif-Resistenz vermittelnde Punktmutation des Donors. Die Zahlen unter der Grafik bezeichnen die Position ausgehend von der Rif-Resistenz verleihenden Punktmutation (negative Zahlen 5'-wärts, positive Zahlen 3'-wärts). Die Reihen zwischen den Stämmen 26695 und J99-R3 zeigen die Sequenzen der analysierten Klone. Abschnitte zwischen zwei Nukleotiden an polymorphen Stellen, die identisch mit denen des Donors waren, sind rot, Sequenzabschnitte, die zwischen zwei polymorphen Nukleotiden lagen, die identisch mit der Sequenz des Rezipienten waren, sind blau eingefärbt. Weiß markierte Bereiche zwischen zwei Polymorphismen bezeichnen Abschnitte, bei denen die Herkunft nicht eindeutig zugeordnet werden kann.

Die Berechnung der mittleren Importlänge ergab, dass diese in der *mutY*-Mutante mit 3268 Bp im Vergleich zum 26695-Wildtyp signifikant erhöht war (BF = 38,88). Die Importlänge war damit etwa doppelt so lang wie im Stamm 26695 (Tabelle 34). Die Anzahl und Größe der ISR wich nicht signifikant von den Wildtyp-Werten ab.

Tabelle 34: Importlänge und ISR der Stämme 26695*mutY* und 26695*mutY*comp nach Transformation mit J99-R3

Rezipient	N ¹	Importlänge ² [Bp]	BF _{Import} ³	M _{ISR} ⁴	BF _M ³	Länge der ISR ⁵ [Bp]	BF _{Länge} ³
26695	95	1681		8		39	
26695 <i>mutY</i>	43	3268	38,88	10	1,15	22	0,39
26695 <i>mutY</i> comp	40	1882	0,08	25	2,28×10 ⁸	116	3,16

Die Transformationen wurden mit genomischer DNA des Stammes J99-R3 durchgeführt. 1: N = Anzahl der analysierten Klone mit DNA-Importen; 2: MLE der Importlängen; 3: BF <3 = nicht signifikant, BF ≥30 = sehr stark signifikant, BF ≥100 = entscheidend; die Berechnung des BF erfolgte in Bezug auf die Kombination 26695/J99-R3; Interpretation des BF siehe S. 55. 4: M_{ISR} = Anzahl der Klone mit ISR; 5: MLE der ISR-Längen

Wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, wurde zur Verifizierung der Ergebnisse die *mutY*-Mutante durch die Einführung eines intakten *mutY*-Gens komplementiert, um zeigen zu können, dass die Verlängerung der Importe in der *mutY*-Mutante direkt durch die Inaktivierung des *mutY*-Gens hervorgerufen wurde. Es zeigte sich, dass die Frequenz Rif-resistenter Klone nach Zugabe von DNA durch die Komplementierung des *mutY*-Gens signifikant beeinflusst wurde. Die Überexpression (Abbildung 9) von *mutY* führte zu einer um 96% niedrigeren Anzahl an Rif-resistenten Klonen pro Zelle als im Wildtyp-Stamm (Abbildung 24).

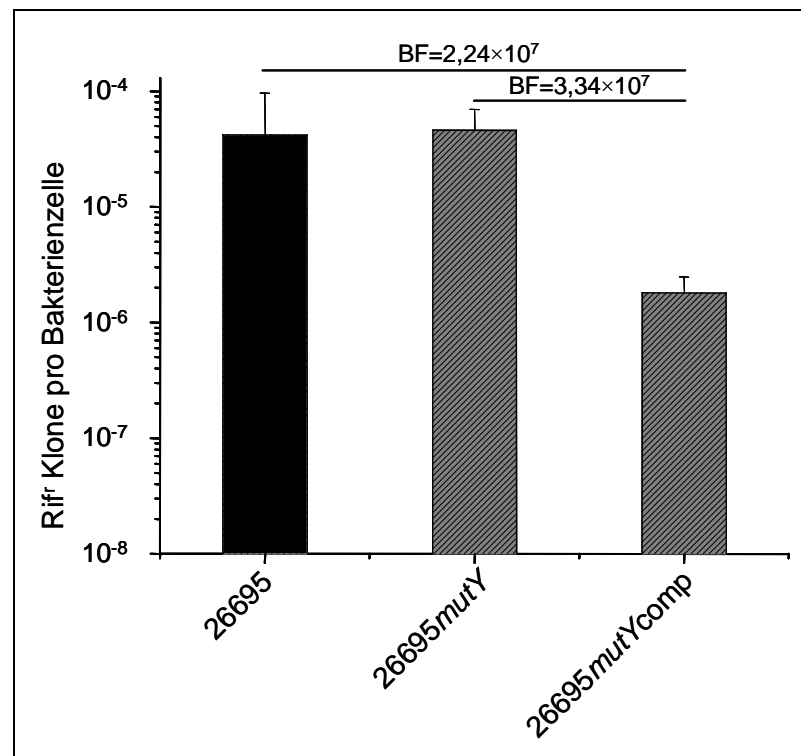


Abbildung 24: Frequenzen Rif-resistenter Zellen nach Inkubation der Stämme 26695, 26695mutY und 26695mutYcomp mit J99-R3 Donor-DNA

In der Abbildung sind die Frequenzen durch Rekombination entstandener Rif-resistenter Klone pro Zelle der Stämme 26695, 26695mutY und 26695mutYcomp nach Inkubation mit DNA des Donor-Stammes J99-R3 dargestellt. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Zwischen dem Wildtyp-Stamm und dem Stamm 26695mutYcomp sowie zwischen der *mutY*-Mutante und dem komplementierten Stamm sind die Frequenzunterschiede signifikant (BF ist angegeben). Zwischen Stämmen, bei denen der BF nicht aufgeführt ist, besteht kein signifikanter Unterschied. ($BF \geq 100$ = entscheidend. Der schwarze Balken kennzeichnet Stämme die miteinander verglichen wurden. Interpretation des BF siehe S. 55) Anzahl der Experimente: 26695: 33, 26695mutY: 6, 26695mutYcomp: 5

Die Untersuchung der *rpoB*-Sequenzen rekombinanter Klone ergab, dass durch die Komplementierung des *mutY*-Gens die Länge der importierten DNA-Fragmente mit 1882 Bp wieder ähnlich wie im 26695 Wildtyp-Stamm war (Tabelle 34) und entsprechend signifikant kürzer als in der *mutY*-Mutante. Von den 40 analysierten Rif-resistenten Klonen des Stammes 26695mutYcomp wiesen 25 Sequenzen eine oder mehrere ISR auf, was einen signifikanten Anstieg im Vergleich zum Wildtyp-Stamm 26695 darstellte ($BF = 2,28 \times 10^8$; Tabelle 34). Insgesamt waren 52 ISR in den importierten DNA-Fragmenten zu sehen. Der Mittelwert der Länge der ISR war 116 Bp, was eine beträchtliche aber nicht signifikante Differenz zum Wildtyp darstellte ($BF = 3,16$; Tabelle 34; Abbildung 25).

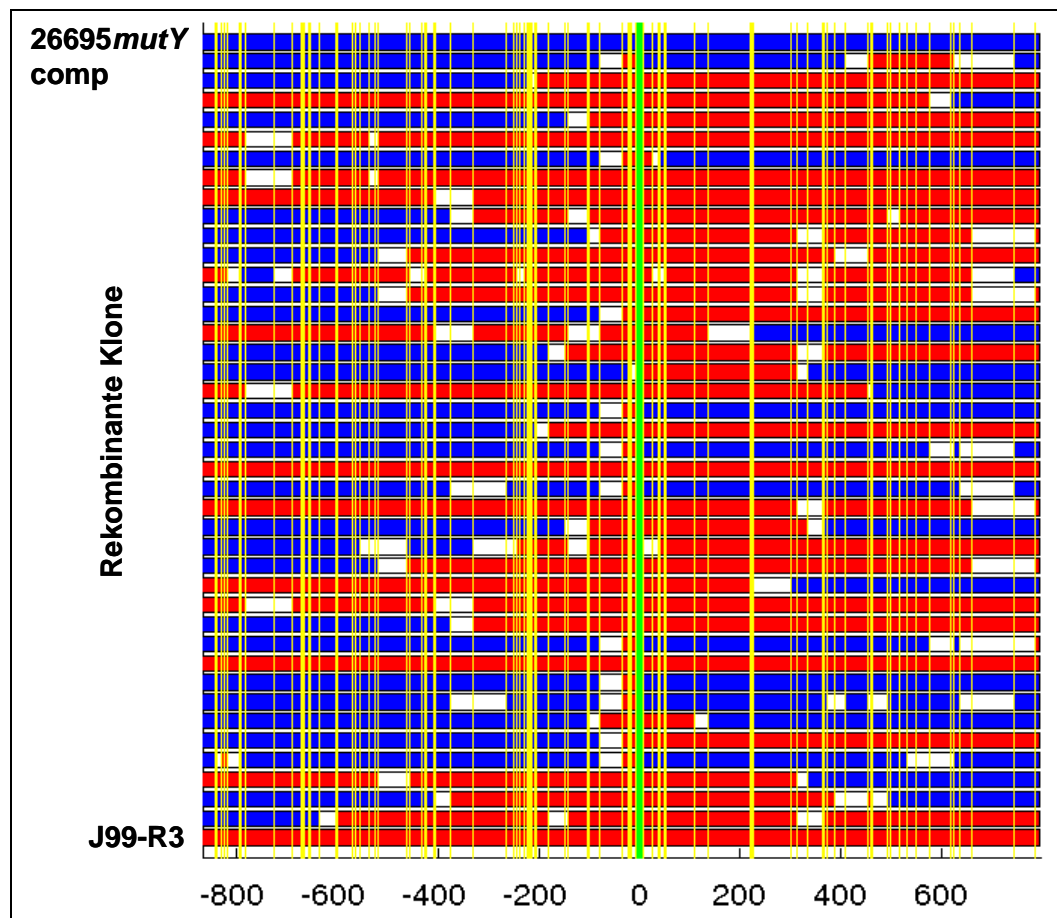


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Sequenz Rif-resistenter Klone des Stammes 26695mutYcomp nach Transformation mit J99-R3 Donor-DNA

Der Farbcode ist in Abbildung 24 erläutert.

5 Diskussion

Die ausgeprägte genetische Variabilität von *H. pylori* ist eine Besonderheit des Bakteriums, welche die Wissenschaft seit mehr als 20 Jahren beschäftigt. Bisher durchgeführte Untersuchungen der Diversität reichen von groß angelegten Studien der Nukleotidsequenzen von *H. pylori*-Populationen aus unterschiedlichen Regionen der ganzen Welt, über Vergleiche von verschiedenen Isolaten derselben Biopsie bis hin zu vergleichenden Analysen sequenzieller Isolate von Patienten (Falush *et al.*, 2001; Kersulyte *et al.*, 1999; Schwarz *et al.*, 2008; Suerbaum *et al.*, 1998). All diese Studien zeigten, dass der Austausch an DNA zwischen verschiedenen *H. pylori*-Stämmen maßgeblich für die genetische Variabilität mit verantwortlich ist. Weiterhin konnte durch die Betrachtung von Sequenzen sequenzieller Isolate ermittelt werden, dass *H. pylori* vergleichsweise kurze DNA-Fragmente in sein Chromosom integriert, die eine berechnete mittlere Länge von 417 Bp hatten (Falush *et al.*, 2001). Hinzu kommt noch eine außergewöhnlich hohe Mutationsrate des Bakteriums, die mit etwa 10^{-6} ähnlich hoch ist, wie die von *E. coli*-Stämmen mit einem defekten „Mismatch“-Reparatur-System (Bjorkholm *et al.*, 2001b) und zusätzlich zur Diversifikation von *H. pylori* beiträgt.

Trotz dieser vielfältigen Studien gibt es nur wenige Analysen der Mechanismen, welche die hohe Mutationsrate, die Rekombination und den Import nur kurzer DNA-Fragmente nach natürlicher Transformation bedingen. Innerhalb dieser Arbeit wurden mit Hilfe eines *in vitro*-Transformationssystems der chromosomale DNA-Import in *H. pylori*-Wildtyp-Stämmen sowie die Mutations- und Rekombinationsfrequenzen genauer charakterisiert. Außerdem wurden *H. pylori*-Mutanten konstruiert, in denen einzelne Gene der DNA-Reparatur- und Rekombinationssysteme des Bakteriums inaktiviert waren. Durch die Untersuchung dieser Mutanten im Transformationssystem konnten Aussagen über den Einfluss der Gene bzw. ihrer Produkte auf die Mutationsfrequenz und den DNA-Austausch in *H. pylori* gemacht werden.

5.1 Mutationsfrequenzen von *H. pylori*-Wildtyp-Stämmen

H. pylori zeichnet sich durch eine sehr hohe Mutationsrate aus. Untersuchungen von 29 *H. pylori*-Isolaten haben gezeigt, dass die Frequenz Rif-Resistenz vermittelnder Mutationen des Bakteriums eine starke Variationsbreite zwischen verschiedenen Stämmen aufweist (zwischen 3×10^{-5} und 4×10^{-8}). Der Medianwert der Mutationsfrequenzen lag in der Studie bei 10^{-6} (Bjorkholm *et al.*, 2001b). Innerhalb dieser Dissertation wurden die Mutationsfrequenzen der *H. pylori*-Stämme 26695, J99 und N6 ermittelt. Dazu wurden die Frequenzen Rif-Resistenz vermittelnder Mutationen der drei Stämme gemessen. Rif-Resistenz wird durch Punktmutationen im Gen *rpoB* vermittelt, welches für die DNA-abhängige RNA-Polymerase kodiert. Das *rpoB*-Gen ist innerhalb der Prokaryoten stark konserviert, wodurch das Rif^R/*rpoB*-System eine universelle Methode zur Analyse von Spontanmutationen in Bakterien darstellt (Garibyan *et al.*, 2003). Die Mutationsfrequenzen der drei untersuchten *H. pylori*-Stämme 26695, J99 und N6 variierten um einem Mittelwert von 1×10^{-6} ($9,5 \times 10^{-7}$ - $1,3 \times 10^{-6}$) und stimmten damit gut mit den von Bjorkholm *et al.* ermittelten Frequenzen überein (z.B. Stamm 26695; diese Arbeit: $9,5 \times 10^{-7}$, Bjorkholm: $1,3 \times 10^{-6}$). Diese Werte liegen weit oberhalb von denen für die meisten anderen Bakterien. In *E. coli* Wildtyp-Stämmen liegt die Frequenz Rif-Resistenz vermittelnder Mutationen beispielsweise im Bereich von etwa 5×10^{-8} (Garibyan *et al.*, 2003; Hasegawa *et al.*, 2008) und nur in Stämmen mit defekten Genen der „Mismatch“-Reparatur oder des Basen-Exzisions-Systems lassen sich Mutationsfrequenzen um 10^{-6} finden (Garibyan *et al.*, 2003; Horst *et al.*, 1999; Miller, 1996). Die erhöhte Mutationshäufigkeit in *H. pylori* hängt wahrscheinlich mit der Abwesenheit wichtiger Proteine der DNA-Reparatur-Systeme zusammen, die in anderen Bakterien Beschädigungen der DNA beheben. So fehlen beispielsweise Teile des „Mismatch“-Reparatur-Systems, wie die Gene *mutH* und *mutL*. Ein *mutS*-Homolog ist zwar auch in *H. pylori* vorhanden, gehört aber zu einer Untergruppe von MutS-Proteinen, die nicht an der Reparatur von Fehlpaarungen der DNA beteiligt sind, sondern Funktionen bei der Rekombination haben (Eisen, 1998; Pinto *et al.*, 2005). Außerdem sind im Gegensatz zu anderen Bakterien in *H. pylori* keine redundanten DNA-Reparaturmechanismen bekannt. In *E. coli* existieren zum Beispiel mehrere Proteine, MutY, MutM und MutT, die Mutationen im Genom entgegen wirken, welche durch den Einbau oxidativ geschädigten Guanins in die DNA hervorgerufen werden (Michaels *et al.*, 1992; Michaels und Miller, 1992). *H. pylori*

besitzt hingegen offenbar nur ein Homolog des *mutY*-Gens, welches Mutationen durch oxidiertes Guanin verhindern kann (Kang und Blaser, 2006a).

5.2 MutY wirkt als starker Antimutator in *H. pylori*

Oxidative Schädigungen der DNA sind ein großes Problem für Lebewesen, da sie hoch mutagen sind und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) nicht nur von außen auf die Zellen einwirken, sondern auch in den Zellen während metabolischer Prozesse als Nebenprodukte entstehen. Eine sehr häufig auftretende Veränderung ist die Oxidation von Guanin zu 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-OxoG). Die mutagene Wirkung von 8-OxoG beruht darauf, dass sowohl Cytosin als auch Adenin Basenpaarungen mit ihm eingehen können, der falsche Einbau des Adenins aber während der Replikation von den entsprechenden Polymerasen nicht erkannt wird (David *et al.*, 2007). Dadurch erhält eine der Tochterzellen nach der Replikation eine Transversion von G:C zu T:A. In *E. coli* sind mehrere Proteine an der Prävention vor Mutationen in der DNA durch 8-OxoG beteiligt (Michaels *et al.*, 1992; Michaels und Miller, 1992). Eine wichtige Rolle spielt dabei die Glykosylase MutY, welche ein Teil des Basen-Exzisions-Systems von Bakterien ist. Die Inaktivierung des *mutY*-Gens in den drei *H. pylori*-Stämmen 26695, J99 und N6 führte zu einer starken Erhöhung der Mutationsfrequenzen im Vergleich zu den Wildtyp-Stämmen. Durch die Komplementierung des *mutY*-Gens im Stamm 26695 *mutY* verringerte sich die Mutationsfrequenz wieder auf ein Niveau, welches mit der Frequenz des Wildtyp-Stammes vergleichbar war. Dadurch konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Erhöhung der Frequenz Rif-resistenter Klone nach der *mutY*-Inaktivierung nicht um Auswirkungen handelte, die indirekt durch die eingebrachte Resistenzkassette hervorgerufen wurden, sondern der Effekt ausschließlich aus der Inaktivierung des *mutY*-Gens resultierte. Die in dieser Arbeit ermittelten Mutationsfrequenzen stimmen gut mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein (Eutsey *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2006; Mathieu *et al.*, 2006). Die drei Gruppen analysierten den Effekt einer *mutY*-Inaktivierung in jeweils einem *H. pylori*-Stamm (SS1/JP26/X47-2AL) und ermittelten einen Anstieg der Mutationsfrequenzen um das 12-, 26- und 325-fache im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Stämmen. Die Analysen in dieser Arbeit zeigten einen 14-, 25- und 26-fachen Anstieg der Mutationsfrequenz nach Inaktivierung von *mutY* und liegen damit zwischen dem niedrigsten und höchsten Wert der anderen Studien. Der sehr hohe Anstieg der Mutationsfrequenz nach der Inaktivierung des *mutY*-Gens in der Studie von Eutsey *et al.*

(325-fach) könnte ein Resultat der unterschiedlichen Methoden zur Messung der Mutationsfrequenzen sein oder einen stammspezifischen Unterschied darstellen. Die Inkubation der Bakterien erfolgte sowohl in der Studie von Eutsey *et al.* als auch in den Experimenten dieser Arbeit bei einer Sauerstoffkonzentration von 5% und kann die vorhandenen Differenzen somit nicht erklären.

5.3 MutY schützt eine bestimmte Position im *rpoB*-Gen effektiver vor Transversionen als andere

Für mehr als zehn verschiedene Punktmutationen im *rpoB*-Gen ist beschrieben, dass sie das Bakterium resistent gegenüber Rifampicin machen. Zur Untersuchung der Mutationen wurde ein 731 Bp großes Fragment des Gens sequenziert, in dem sich die meisten der Rif-Resistenz vermittelnden Mutationen befinden (Abbildung 11). Die genaue Charakterisierung der Verteilung der Punktmutationen in den drei Wildtyp-Stämmen 26695, J99 und N6 ergab, dass die Rif-Resistenz besonders häufig durch eine C→A-Transversion an der Position 1573 im *rpoB*-Gen hervorgerufen wurde. Die Inaktivierung des Gens *mutY* in den Stämmen führte zu einer Verschiebung der häufigsten Mutation. Analysen Rif-resistenter Klone der drei *mutY*-Mutanten 26695*mutY*, J99*mutY* und N6*mutY* zeigten, dass für die Rif-Resistenz der Klone meistens eine Transversion an der Position 1618 verantwortlich war, die in den Wildtyp-Stämmen deutlich seltener zu finden war. Die Mutationsrate war an Position 1618 im Stamm J99 fast 90-fach und in den beiden anderen Stämmen sogar mehr als 240-fach erhöht. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Position 1618 von MutY besonders effektiv geschützt wird, wohingegen die MutY-Glykosylase nur einen geringen oder gar keinen Effekt auf die anderen im Wildtyp vorgefundenen Punktmutationen hat. Nur im Stamm N6 wurde zusätzlich eine 22-fache Erhöhung der C→A-Transversionen an der Position 1573 ermittelt. Der Grund für den besonderen Schutz bestimmter Nukleotide durch MutY ist bisher noch nicht geklärt. Rif-resistente Stämme mit einer Mutation an Position 1573 und Stämme mit einer Rif-Resistenz vermittelnden Mutation an Position 1618 zeigten keine Unterschiede in ihren Wachstumskurven und auch die minimale Hemmkonzentrationen (MHK) von Rifampicin waren in beiden Stämmen sehr hoch (>256 µg/ml). Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen des bakteriellen Wachstums und der MHK der beiden Rif-resistenten Stämme konnten durch die Mutation an Position 1618 hervorgerufene Wachstumsdefizite oder unterschiedliche Resistenzen gegen Rifampicin als Ursache für die unterschiedlich

effektive Reparatur von C→A-Transversionen an der Position 1573 und der Position 1618 ausgeschlossen werden. Sanchez *et al.* konnten in einer Untersuchung der MutY-Glykosylase von *E. coli* zeigen, dass der Sequenzkontext die Effektivität der Reparatur durch das Enzym beeinflusst (Sanchez *et al.*, 2003). In der Studie stellten sie fest, dass eine Fehlpaarung innerhalb der Sequenz G-AG-T (die unterstrichenen Buchstaben stellen die Fehlpaarung dar) stabiler war und dadurch seltener durch MutY repariert wurde, als wenn die Fehlpaarung innerhalb der Sequenz G-AG-A lag. Da in der *rpoB*-Sequenz von *H. pylori* die Position 1618 (häufigste Punktmutation in Rif-resistenten *mutY*-Mutanten) von den Nukleotiden G und A umgeben ist und die Position 1573 (häufigste Mutation in Rif-resistenten Klonen der Wildtyp-Stämme) von G und T flankiert ist, könnte das *E. coli*-Modell eine Erklärung für die Unterschiede in der Mutationsverteilung zwischen *H. pylori* Wildtyp-Stämmen und *mutY*-Mutanten sein.

5.4 Ein Verlust von MutY führt zu einem Fitnessdefizit in *H. pylori*

Der Vergleich der Wachstumskurven des Stammes 26695 und der isogenen *mutY*-Mutante zeigte, dass die Inaktivierung des Gens keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien in Flüssigkulturen hatte (Abbildung 13). Dennoch war möglich, dass der Verlust der MutY-Glykosylase zu Nachteilen in der Fitness gegenüber Stämmen mit einem intakten Protein führen könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die Stämme 26695 und 26695*mutY* ko-kultiviert und der Anteil eines jeden Stammes in der Kultur an verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Abbildung 14). Beide Stämme wiesen in der lag- und exponentiellen Phase ein einheitliches Wachstum auf, in der stationären Phase der Kultur nahm der Anteil kultivierbarer Bakterien der Mutante aber stark ab und nach 48 Stunden waren über 90% der Kolonie-bildenden Einheiten 26695 Wildtyp-Bakterien. Der Grund dafür könnte eine Anhäufung von Mutationen im Chromosom der Mutante sein, die den Stamm z.B. im Wettbewerb um Nährstoffe mit dem Wildtyp-Stamm in der Flüssigkultur benachteiligten. Dieser Verlust der Fitness könnte auch der Grund für eine schlechtere Besiedelung des Magens der Maus durch eine *mutY*-Mutante sein, die von Eutsey *et al.* beobachtet wurde (Eutsey *et al.*, 2007).

5.5 Phasenvariabilität von *mutY* und die Auswirkung auf die Mutationsrate

Phasenvariable Gene spielen eine wichtige Rolle in der Diversitätsentwicklung von *H. pylori* (Suerbaum und Josenhans, 2007). Das *mutY*-Gen von *H. pylori* enthält eine homopolymere Sequenzwiederholung aus acht Adeninresten, welche eine Regulation des Gens durch Phasenvariation bewirken könnte. Da die Sequenz eines *mutY*-Fragments, welche die Sequenzwiederholung des Gens enthielt, Teil eines der Fragmente des *H. pylori*-MLST-Schemas ist (Achtman *et al.*, 1999), das in mehreren großen Studien der globalen Diversität von *H. pylori* eingesetzt wurde (Falush *et al.*, 2003; Linz *et al.*, 2007), war es möglich, die Variabilität der homopolymeren Sequenz in über 1600 Stämmen zu analysieren. Die Stämme SA166A und JP9 wiesen anstelle der acht Adeninreste nur sieben Adeninreste in der Sequenzwiederholung auf. Diese zwei Stämme konnten zusätzlich zum Stamm Ala15, der ebenfalls einen 7×A-„Repeat“ aufweist (Huang *et al.*, 2006), innerhalb dieser Arbeit durch die Sequenzrecherche in einer größeren Datenbank ermittelt werden (Linz *et al.*, 2007). Durch die verkürzte Sequenzwiederholung kommt es zu einer Leserasterverschiebung, die zu einem verfrühten Stopp-Kodon im *mutY*-Gen führt. Die Stämme Ala15 und SA166A standen für Analysen zur Verfügung und wurden zur Bestimmung der Mutationsfrequenzen sowie zur Untersuchung der Verteilung der Rif-Resistenz vermittelnden Punktmutationen im *rpoB*-Gen genutzt. Anders als es der Verlust von MutY erwarten ließ, wiesen die beiden Stämme Mutationsfrequenzen auf dem Niveau der untersuchten Wildtyp-Stämme mit intaktem *mutY*-Gen auf. Allerdings war die Verteilung der Mutationen ähnlich wie in den *mutY*-Mutanten der Stämme 26695, J99 und N6 mit einer C→A-Transversion an Position 1618 des *rpoB*-Gens als häufigste Punktmutation (Abbildung 12 und Abbildung 15). Diese Beobachtungen zeigen, dass die Mutationsrate in *H. pylori* von verschiedenen Faktoren abhängt. Die natürliche Inaktivierung des *mutY*-Gens könnte beispielsweise dazu dienen, eine sehr niedrige Mutationsrate des parental Stammes zu kompensieren. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass andere Reparaturmechanismen in den Stämmen hoch reguliert sind, um die erhöhte Mutationsrate durch den Wegfall der MutY-Glykosylase aufzufangen. Die letztere Hypothese wird durch die Ergebnisse gestützt, dass trotz einer niedrigen Mutationsfrequenz die Verteilung der Rif-Resistenz vermittelnden Punktmutationen denen der *mutY*-Mutanten ähnelte.

5.6 Rekombinationsfrequenzen von *H. pylori*-Wildtyp-Stämmen

Neben der sehr hohen Mutationsrate ist eine weitere Besonderheit von *H. pylori* der häufige Austausch von DNA zwischen verschiedenen Stämmen. Dieser beruht auf der natürlichen Kompetenz des Bakteriums (Nedenskov-Sorensen *et al.*, 1990). Ein wichtiger Mechanismus ist dabei der Import exogener DNA in das Zellinnere des Bakteriums mit Hilfe des ComB-DNA-Aufnahmesystems (Hofreuter *et al.*, 1998; Hofreuter *et al.*, 2001; Karnholz *et al.*, 2006; Smeets und Kusters, 2002). Zur Bestimmung der Transformationsfrequenzen der *H. pylori*-Wildtyp-Stämme 26695, J99 und N6 wurden diese in einem eigens dafür entwickelten *in vitro*-Transformationssystem (Kraft, 2004) mit DNA verschiedener *H. pylori*-Donor-Stämme inkubiert und anschließend rekombinante Klone selektiert. Als Selektionsmarker wurde eine Punktmutation im *rpoB*-Gen der Donor-Stämme genutzt, welche Resistenz gegen Rifampicin verleiht. Das System ermöglichte es, die Häufigkeit Rif-resistenter Klone nach der Inkubation mit Donor-DNA (Rekombinantenfrequenz) zu ermitteln. Durch die Inkubation mit Donor-DNA erhöhte sich die Anzahl Rif-resistenter Klone um das 22- bis 199-fache im Vergleich zur Anzahl Rif-resistenter Spontanmutanten. Die Frequenz Rif-resistenter Klone pro Bakterienzelle lag im Mittel bei 9×10^{-5} , variierte aber in Abhängigkeit von der Kombination von Rezipienten-Stamm und Donor-DNA stark (Abbildung 17). So lag die Frequenz des Stammes 26695 bei $4,2 \times 10^{-5}$, wenn er mit DNA des Stammes J99-R3 transformiert wurde; die Inkubation mit Donor-DNA des Stammes N6-R1 resultierte hingegen in einer signifikanten um ein Drittel niedrigeren Frequenz Rif-resistenter Klone. Auch im Stamm N6 wichen die Frequenzen nach der Inkubation mit der DNA zweier verschiedener Donor-Stämme (26695-R1, J99-R3) voneinander ab. Die Transformation mit DNA des Stammes J99-R3 war neunmal effizienter als eine Transformation mit 26695-R1-DNA und im Vergleich zur Kombination 26695/J99-R3 war die Frequenz der Kombination N6/J99-R3 um mehr als das Zweifache erhöht. Die Umkehr der Stamm-Kombination 26695/J99-R3, J99/26695-R1, resultierte in einem hoch signifikanten siebenfachen Anstieg der Frequenz Rif-resistenter Klone. Dieses Experiment zeigt, dass die Richtung der Transformation die Frequenz stark beeinflusst und deutet darauf hin, dass Eigenschaften des Rezipienten für die Transformationsfrequenz verantwortlich sind. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass die Transformationsfrequenz nicht nur vom Grad der Homologie der DNA abhängig ist.

Um zu untersuchen, ob die teils stammspezifischen Restriktions-Modifikations-Systeme (RM-Systeme) der *H. pylori*-Stämme bei der Regulation der Rekombinationsfrequenzen eine Rolle spielen (Kong *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001; Vale und Vitor, 2007; Vitkute *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2000), wurde der Stamm 26695 mit einem PCR-Fragment des *rpoB*-Gens des Stammes J99-R3 transformiert. Da PCR-Produkte nicht methyliert sind, müsste das *rpoB*-Fragment von allen RM-Systemen des Rezipienten als „fremd“ erkannt werden, so dass nicht nur die stammspezifischen RM-Systeme die Frequenz Rif-resistenter Klone beeinflussen, wie es bei der Transformation mit genomischer DNA der Fall ist. Dadurch könnte es zu einer Veränderung der Frequenz kommen, da das PCR-Produkt stärker abgebaut würde. Die Inkubation des Stammes 26695 mit einem PCR-Produkt des Stammes J99-R3 führte zu keiner signifikanten Veränderung der Frequenz Rif-resistenter Klone im Vergleich zur Frequenz des Stammes nach der Inkubation mit genomischer DNA des Stammes J99-R3. Somit konnte zumindest in dieser Stamm-Kombination keine Auswirkung der RM-Systeme auf die Frequenz Rif-resistenter Klone nach der Inkubation mit einem unmethylierten PCR-Fragment nachgewiesen werden. Auch Aras *et al.* konnten keinen Unterschied in der Transformationsfrequenz nach der Zugabe von genomischer DNA eines Streptomycin-resistenten Stammes im Vergleich zur Transformationsfrequenz nach der Zugabe eines PCR-Produkts des resistenten Stammes beobachten (Aras *et al.*, 2002), so dass RM-Systeme zumindest bei der Regulation der Transformationsfrequenz nach Kontakt mit linearer DNA in *H. pylori* wahrscheinlich keine große Rolle spielen.

5.7 Länge der DNA-Importe in *H. pylori*-Wildtyp-Stämmen

Sequenzuntersuchungen von zehn Genfragmenten sequenzieller *H. pylori*-Isolate haben gezeigt, dass die analysierten Stämme häufig eine Mosaikstruktur in ihren Sequenzen aufwiesen, die ein Resultat von Rekombinationsereignissen zwischen unterschiedlichen *H. pylori*-Stämmen war. Die Berechnung der Importlängen in diesen Stämmen ergab, dass die in das Genom integrierten DNA-Fragmente eine mittlere Länge von nur 417 Bp hatten (Falush *et al.*, 2001). Damit war die Importlänge in *H. pylori* deutlich kürzer als Importlängen anderer Bakterienarten, bei denen die Länge der integrierten Fragmente zwischen 2000 Bp und 14000 Bp lagen (Enright und Spratt, 1999; Fornili und Fox, 1977; Guild *et al.*, 1968; Linz *et al.*, 2000; McKane und Milkman, 1995).

Trotz dieser außergewöhnlichen Eigenschaft von *H. pylori* ist die Länge der DNA-Importe bisher noch nicht *in vitro* unter standardisierten Bedingungen analysiert worden. Durch die Sequenzierung eines 1663 Bp langen Fragments des *rpoB*-Gens Rif-resistenter Klone aus einem Transformationsexperiment war es möglich, die Länge der in das Genom integrierten DNA in verschiedenen Rezipient/Donor-Kombinationen zu ermitteln. Insgesamt wurden 258 Klone der Wildtypstämme 26695, J99 und N6 nach Transformation mit DNA verschiedener Donor-Stämme, die DNA des Donors inklusive der Rif-Resistenz vermittelnden Punktmutation importiert hatten, analysiert. Die berechnete mittlere Länge der DNA-Importe lag zwischen 1294 Bp und 3853 Bp und differierte signifikant zwischen verschiedenen Kombinationen von Rezipienten-Stamm und Donor-DNA. Die Importlänge wurde mit Hilfe eines Modells abgeschätzt, welches auf Bayes'scher Statistik beruhte. Dieses Modell wurde von unseren Kooperationspartner Dr. Xavier Didelot entwickelt. Die Anwendung eines solchen komplexen Modells war notwendig, da nicht in allen Klonen ein Anfangs- und Endpunkt des DNA-Imports in dem sequenzierten Fragment vorhanden war. In manchen Klonen war nur ein einzelnes Ende des Imports zu finden und andere Klone hatten DNA über die gesamte 1663 Bp lange Sequenz hinweg integriert. Eine Berechnung der Importlänge unter der Annahme eines Importmaximums von 1663 Bp hätte zu einer Unterschätzung der Länge der importierten DNA geführt und somit die Wirklichkeit nur sehr bedingt widerspiegelt. Das mathematische Modell ermöglichte es, trotz dieser Problematik eine genaue Abschätzung der Importlängen zu machen. Obwohl diese Importlängen im Vergleich zu anderen Bakterienarten immer noch kurz waren, übertrafen sie die Längen, die in der Studie von Falush *et al.* bestimmt wurden, um das Drei- bis Neunfache. Es gibt mehrere Möglichkeiten, die für diese deutlichen Unterschiede verantwortlich sein könnten. Zum einen sind die Sequenzen eines klinischen Isolats nur Momentaufnahmen eines einzelnen Klons ohne die Kenntnis der genauen Sequenz des Rezipienten und vor allem ohne die Kenntnis der Sequenz des Donor-Stammes. Die Donor-DNA könnte beispielsweise von einem Stamm stammen, der bereits selbst DNA des anderen Stammes in sein Genom integriert hat, so dass nur noch ein verkürzter Abschnitt der ursprünglichen Sequenz des Donors vorhanden ist. Zum anderen könnten auch stammspezifische Unterschiede zwischen den von Falush *et al.* charakterisierten sequenziellen Isolaten und den in dieser Arbeit analysierten Wildtyp-Stämmen für die Diskrepanz zwischen den Importlängen verantwortlich sein. Dafür spräche die Beobachtung, dass sich auch die im Transformationssystem ermittelten Importlängen um einen Faktor von drei zwischen der kürzesten und der längsten ermittelten mittleren

Importlänge unterschieden. Weiterhin sind an dieser Stelle die methodischen Unterschiede der beiden Untersuchungen zu diskutieren. Die mit Hilfe der *in vitro*-Transformation ermittelten Importlängen sind durch die Betrachtung eines einzelnen langen Genfragments (1663 Bp) unter Verwendung eines Selektionsmarkers bestimmt worden. Hingegen wurden zur Analyse der sequenziellen Isolate zehn kurze Genfragmente (insgesamt 4658 Bp) ohne Selektionsdruck betrachtet. Auch die Zeiträume, in denen sich Rekombinationsereignisse abspielen konnten, variieren stark zwischen den beiden Studien. In dieser Arbeit wurde der Rezipient für nur acht Stunden mit der DNA des Donor-Stammes zusammen inkubiert, so dass es zu einer Zellteilung kommen konnte. Durch diese kurze Inkubationszeit wurde die Wahrscheinlichkeit für weitere Rekombinationsereignisse und Punktmutationen im *rpoB*-Gen minimiert. Die Biopsieentnahmen zur Analyse der sequenziellen Isolate lagen mehrere Monate auseinander, was die Möglichkeit mehrfacher DNA-Austausche zwischen Stämmen erhöhte. Letztlich ist auch die Probengröße ein entscheidender Unterschied zwischen den beiden Arbeiten. Nur acht Klone mit Importen standen für die Analysen der klinischen Isolate zur Verfügung. In dieser Arbeit basieren die ermittelten Werte auf die Untersuchung von 25 bis 95 Klonen pro Stamm-Kombination.

Die Sequenzen der Rezipienten- und Donor-Allele unterscheiden sich im analysierten *rpoB*-Fragment je nach Stammkombination zwischen 3,8% und 5,4%, was die Frage aufwirft, ob die Differenzen der Importlängen verschiedener Rezipient/Donor-Kombinationen durch diese Sequenzunterschiede bedingt sind. Gegen diese Hypothese sprechen Versuche, in denen die Kombinationen von Rezipient und Donor vertauscht wurden, also die Sequenzunterschiede zwischen den beiden Stämmen gleich blieben. Im einen Fall (26695/J99-R3 und J99/26695-R1) kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Importlängen, wohingegen sich im zweiten Fall (26695/N6-R1 und N6/26695-R1) die Längen der integrierten DNA beträchtlich unterschieden. Vergleiche der Importlängen zeigten, dass die Länge der integrierten DNA durch den Rezipienten bestimmt wurde und unabhängig von der verwendeten Donor-DNA war. Diese Beobachtung wurde durch Versuche gestützt, in denen jeweils derselbe Rezipienten-Stamm (26695 bzw. N6) mit DNA aus verschiedenen Donor-Stämmen transformiert wurde. Zwischen den beiden Transformationen desselben Stammes mit verschiedenen Donor-DNA kam es zu keinen signifikanten Unterschieden bezüglich der Importlänge, wohingegen die Importe zwischen den beiden Rezipienten 26695 und N6 deutlich voneinander abwichen. Auch für eine Beteiligung der Restriktions-Modifikations-Systeme des Rezipienten in der Bestimmung der Importlängen konnten keine

Hinweise gefunden werden. Die Integration der DNA folgte einer geometrischen Verteilung, die keine bestimmten Sequenzmotive an den Rekombinationsstart- bzw. -endpunkten erkennen ließ. Hinzu kommt, dass die Importlänge nach Transformation mit einem PCR-Produkt nicht signifikant von der Länge nach Transformation mit genomischer DNA abwich, obwohl dieses aufgrund der fehlenden DNA-Methylierung häufiger von Restriktionsendonukleasen erkannt und abgebaut werden müsste.

Die Analyse der Rekombination umfasste zwei Parameter, zum einen die Frequenz Rif-resistenter Klone nach der Zugabe von Donor-DNA und zum anderen die Länge der importierten DNA-Fragmente. Bisher wurde noch nicht gezeigt, ob diese beiden Parameter miteinander korrelieren, also beispielsweise eine hohe Frequenz Rif-resistenter Klone nach der Inkubation mit Donor-DNA mit einer Integration kürzerer DNA-Fragmente zusammenhängt. Der Vergleich der Importlänge und der Frequenz Rif-resistenter Klone nach der Zugabe von Donor-DNA der analysierten Wildtyp-Rezipient/Donor-Kombinationen zeigte, dass es keinen Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern der Rekombination gab. So unterschied sich die Länge der importierten DNA-Fragmente des Rezipienten-Stammes N6 nach der Transformation mit DNA des Donor-Stammes J99-R3 (3853 Bp) nicht signifikant von der Importlänge nach einer Transformation mit DNA des Stammes 26695-R1 (3819 Bp). Hingegen war die Frequenz Rif-resistenter Klone nach der Transformation mit J99-R3 signifikant höher als nach der Zugabe von 26695-R1 DNA (Abbildung 24). Auch bei der Betrachtung verschiedener Rezipienten war eine Korrelation der Importlänge mit der Frequenz Rif-resistenter Klone nicht vorhanden. Vergleiche der Frequenz Rif-resistenter Klone der Kombination 26695/J99-R3 mit den Kombinationen J99/26695-R1 und N6/J99-R3 zeigten, dass beide Stamm-Kombinationen eine signifikant höhere Frequenz aufwiesen. Die Importlänge der Kombination J99/26695-R1 unterschied sich aber nicht von der des Rezipienten 26695, die der Kombination N6/J99-R3 war hingegen signifikant länger. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass unterschiedliche Mechanismen die beiden wichtigen Parameter der Rekombination, Frequenz des Einbaus von Donor-DNA und Importlänge, kontrollieren.

5.8 Importierte DNA-Fragmente sind durchsetzt mit Segmenten der Rezipienten-Sequenz

Eine Besonderheit der untersuchten DNA-Importe war, dass in etwa 10% der Klone das integrierte Donor-Fragment von kurzen Abschnitten der Rezipienten-Sequenz unterbrochen wurde. Diese Unterbrechungen des importierten Fragments haben wir als „interspersed sequences of the recipient“ (ISR) bezeichnet (Kulick *et al.*, 2008a). Im Mittel betrug die Länge dieser ISR in den untersuchten *H. pylori* Wildtyp-Stämmen 84 Bp, ohne signifikante Unterschiede bezüglich der Häufigkeit oder mittleren Größe zwischen verschiedenen Rezipient/Donor-Kombinationen. Diese Beobachtung war für uns von besonderem Interesse, da ISR eine wichtige Rolle in der Diversifikation von Allelen in *H. pylori* spielen könnten, indem sie die Verbindung zwischen einzelnen individuellen Polymorphismen aufheben. Dadurch tragen sie zusammen mit der Integration nur kurzer DNA-Fragmente in das Genom des Bakteriums zu dem niedrigen Kopplungsungleichgewicht von *H. pylori* bei (Suerbaum *et al.*, 1998).

Einen Hinweis auf das Vorkommen von ISR in *H. pylori in vivo* gaben Analysen sequenzieller Isolate, die DNA eines anderen Stammes importiert hatten (Falush *et al.*, 2001). In den Sequenzen der Stammpaare ließen sich innerhalb der importierten Fragmente mit Polymorphismen auch Segmente finden, in denen die Sequenzen identisch waren, wie beispielsweise in den *atpA*-Allelen des Stammes NQ352 (Falush *et al.*, 2001). Da aber nur die Sequenzen des Rezipienten- und des Rekombinanten-Stammes nicht aber die Sequenz der Donor-DNA bekannt sind, kann nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden, dass es sich bei diesen identischen Sequenzabschnitten zwischen polymorphen Bereichen um ISR handelt.

Ob ISR ein *H. pylori*-spezifisches Phänomen sind, kann anhand der vorhandenen Literatur nicht eindeutig belegt werden. Zusammengesetzte DNA-Mosaik, die den ISR entsprechen könnten, wurden auch schon in *E. coli* beobachtet. In den Versuchen mit *E. coli* wurden Plasmide in die Bakterienzellen transformiert, welche einen Heteroduplex-DNA-Abschnitt enthielten. Reisolierete Plasmide wurden anschließend mit Hilfe von Hybridisierungssonden analysiert (Abastado *et al.*, 1984; Cami *et al.*, 1984). Sowohl in Wildtyp-Bakterien als auch in *recA*-negativen Bakterien wurden Mosaikstrukturen nachgewiesen, was dafür spricht, dass die Strukturen ein Resultat von DNA-Reparatur-Ereignissen waren. Eine weitere Studie, in der Heteroduplex-DNA des Lambda-Bakteriophagen in *E. coli*-Zellen untersucht wurde (Raposa und Fox, 1987), konnte eine Beteiligung des „Mismatch“-Reparatur-Systems (MutL, MutS,

MutH und UvrD) zeigen und beobachten, dass die Reparaturen der Fehlpaarung bis zu 2000 Bp auseinander lagen. McKane und Milkman nutzten Restriktionsfragment-Polymorphismen, um DNA-Importe in *E. coli* nach der Transduktion eines etwa 100 kb großen DNA-Fragments zu untersuchen (McKane und Milkman, 1995). Sie fanden heraus, dass der Import häufig in mehrere 8 kb bis 14 kb lange Fragmente aufgeteilt war und dass die Länge der Fragmente vom untersuchten Rezipienten-Stamm abhing. Sie vermuteten, dass Unterschiede in den Restriktions-Modifikations-Systemen der Stämme dafür verantwortlich sein könnten. Sequenzanalysen der importierten DNA wurden bisher in keiner Studie durchgeführt.

Als mögliche Ursache für die Entstehung der ISR wurde die Beteiligung von RM-Systemen angenommen. Um eine mögliche Verbindung zwischen der Entstehung von ISR und RM-Systemen aufzudecken, wurden 36 Restriktionsschnittstellen durch unseren Kooperationspartner Dr. Xavier Didelot in dem sequenzierten *rpoB*-Fragment Rif-resistenter Klone analysiert. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der ISR und den analysierten Sequenzmotiven gezeigt werden. Die Ergebnisse der Analysen schließen aber eine Existenz bestimmter Muster innerhalb der DNA nicht völlig aus, da das untersuchte *rpoB*-Fragment, bezogen auf das Gesamtgenom, verhältnismäßig kurz ist und somit manche Schnittstellen nur ein oder zwei Mal in der Sequenz vorkommen. Dadurch wird eine Untersuchung solcher Motive sehr schwierig.

5.9 Das ComB-DNA-Aufnahmesystem hat keinen Einfluss auf die Länge der DNA-Importe

Da der erste Kontakt mit freier DNA und der Import der DNA in die Zelle in *H. pylori* über ein besonderes DNA-Aufnahmesystem (ComB) stattfindet, haben wir die Hypothese aufgestellt, dass die Passage der DNA durch dieses System für die geringe Länge der DNA Importe und möglicherweise auch für die Entstehung von ISR verantwortlich sein könnte. Um die Importe der Donor-DNA ohne die Passage durch das ComB-System untersuchen zu können, musste das System zuvor ausgeschaltet werden. Dazu wurde das Gen *comB10* im *H. pylori*-Stamm 26695 inaktiviert, welches für ein wichtiges Strukturprotein des Aufnahmeapparates kodiert (Hofreuter *et al.*, 2003; Terradot *et al.*, 2005). Wie erwartet führte die Inkubation der Mutante mit Donor-DNA nicht zu einer Erhöhung der Anzahl Rif-

resistenter Klone im Vergleich zur Mutationsfrequenz. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass keiner der analysierten Klone ein Fragment der Donor-DNA in sein Genom integriert hatte, so dass durch diesen Versuch auch verifiziert wurde, dass freie genomische DNA aus der Umgebung von *H. pylori* ausschließlich über das ComB-System aufgenommen werden kann. Um das Aufnahmesystem zu umgehen bzw. um auch ohne ein funktionierendes ComB-System DNA in die Bakterien zu bringen, wurde die *comB10*-Mutante zusammen mit Donor-DNA elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen für acht Stunden inkubiert und die Frequenz Rif-resistenter Klone sowie die Länge der DNA-Importe analysiert. Nach der Elektroporation war die Frequenz Rif-resistenter Klone im Stamm 26695*comB10* ähnlich hoch wie die Frequenz nach einer natürlichen Transformation des Wildtyp-Stammes 26695. Die signifikant höhere Frequenz Rif-resistenter Klone nach der Elektroporation des Stammes 26695*comB10* mit Donor-DNA im Vergleich zur Frequenz nach der Inkubation mit Donor-DNA im *in vitro*-Transformationssystem zeigte, dass wieder DNA in das Genom des Bakteriums integriert wurde. Die Integration von Donor-DNA in das Genom des Stammes wurde durch die Sequenzierung Rif-resistenter Klone bestätigt. Die Länge der DNA-Fragmente zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Länge von Importen nach natürlicher DNA-Aufnahme. Damit konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme der DNA durch das ComB-System die Importlänge nicht beeinflusst.

Die Elektroporation hatte allerdings einen signifikanten Einfluss auf die Frequenz von ISR in den importierten DNA-Fragmenten, die um etwa das Vierfache erhöht war. Dieser Anstieg könnte ein Resultat des elektrischen Feldes sein, das eventuell Schädigungen der DNA hervorruft und dadurch eine erhöhte Expression der DNA-Reparatur-Enzyme zur Folge haben könnte, die zu einer gesteigerten Reparatur von Basenfehlpaarungen führt.

Die Anzahl der ISR in Sequenzen von elektroporierten Wildtyp-Klonen war im Vergleich zur Anzahl an ISR nach natürlicher Transformation des Stammes leicht (2-fach) aber nicht signifikant erhöht. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die Elektroporation im Wildtyp-Stamm nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl an ISR in der integrierten DNA führte, könnte das noch aktive ComB-System sein. Während die *comB10*-Mutante nur durch die Elektroporation oder durch die Durchquerung der Zellmembran eventuell häufiger veränderte DNA integrieren konnte, war der Wildtyp-Stamm in der Lage, zusätzlich auch DNA über das DNA-Aufnahmesystem in die Zelle zu importieren, die nicht verändert oder beschädigt war. Sowohl die veränderte als auch die native Donor-DNA wurde dann in das

Genom integriert. Auch ein Vergleich der ISR-Frequenzen des Wildtyp-Stammes und der *comB10*-Mutante würde für einen solchen kompetitiven Prozess sprechen, da die ISR-Frequenz nach der Elektroporation der Mutante genau doppelt so hoch war wie die ISR-Frequenz nach Elektroporation des Wildtyp-Stammes. Dass es durch die Elektroporation nicht zu einer Erhöhung der Frequenz Rif-resistenter Zellen im Stamm 26695 kommt, ist dadurch bedingt, dass die Transformation von DNA einer Sättigungsfunktion folgt (Levine *et al.*, 2007) und somit die Frequenz Rif-resistenter Rekombinanten ab einer bestimmten DNA-Konzentration in der Zelle nicht weiter ansteigt.

5.10 RecA ist essentiell für die Rekombination in *H. pylori*

Die Rekombination ist ein Prozess, an dem eine Vielzahl von Proteinen beteiligt ist (Kowalczykowski *et al.*, 1994; Kowalczykowski, 2000; Kuzminov, 1999). Eine zentrale Rolle spielt dabei das RecA-Protein, welches an einzelsträngige DNA in der Zelle bindet und nach homologen Bereichen im Chromosom sucht. Dort initiiert es mit Hilfe anderer Proteine die homologe Rekombination (Cox, 2003; Cox, 2007). Wie erwartet führte die Inaktivierung des *recA*-Gens zu einer Rekombinations-negativen *H. pylori*-Mutante. Diese Beobachtungen stimmen mit denen anderer Arbeitsgruppen überein, die in RecA-negativen Stämmen ebenfalls einen Rückgang der Transformationsfrequenz feststellen konnten. Diese Gruppen konnten durch ihre Untersuchungen außerdem zeigen, dass die *recA*-Mutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber verschiedenen Stressfaktoren, wie UV-Licht oder Metronidazol, aufwiesen (Fischer und Haas, 2004; Schmitt *et al.*, 1995; Thompson und Blaser, 1995), was für eine verminderte Fähigkeit der Reparatur der DNA in den Mutanten spricht. Durch die Untersuchung der Mutationsfrequenz des Stammes 26695*recA* konnte in dieser Dissertation zusätzlich noch gezeigt werden, dass die Inaktivierung des *recA*-Gens in einem Rückgang der Frequenz Rif-resistenter Klone um 94% resultiert. Auch in *E. coli* ist die wichtige Rolle des RecA-Proteins in der Rekombination beschrieben (Cox, 2003; Cox, 2007) und eine niedrigere Frequenz Rif-Resistenz vermittelnder Mutationen im *rpoB*-Gen wurde in *E. coli* ebenfalls beobachtet (Otterlei *et al.*, 2000). Wodurch die niedrigere Mutationsfrequenz hervorgerufen wird, konnte bisher allerdings noch nicht geklärt werden. Eine Möglichkeit wäre, dass die Rekombination selbst einen mutagenen Effekt in den Zellen hat, wie es für *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben wurde. In der Hefe war die Mutationsrate während der Meiose 20 Mal höher, als während der mitotischen Vermehrung (Magni und Von Borstel, 1962). Die

Inaktivierung von *recA* und die damit verbundene sehr stark verminderte Rekombination könnten somit der Grund für die niedrigere Mutationsrate sein. Hierbei bleibt zu berücksichtigen, dass mit Hilfe des $\text{Rif}^{\text{R}}/\text{rpoB}$ -Systems nur Punktmutationen und keine Deletionen oder Insertionen untersucht werden können, da eine Leserasterverschiebung zu einem Ausfall der DNA-abhängigen RNA-Polymerase und somit zum Absterben der Bakterien führte. Weiterhin ist es möglich, dass RecA in *H. pylori* regulatorische Funktionen besitzt und durch den Wegfall des Enzyms die Reparatur von Punktmutationen begünstigt wurde.

5.11 Das *recB*-Homolog HP1553 spielt eine wichtige Rolle in der Rekombination von *H. pylori*

In der Genomsequenz des Stammes 26695 wurde für das Gen HP1553 eine Ähnlichkeit mit ATP-abhängigen Nukleasen vorhergesagt (<http://genolist.pasteur.fr>). Vergleiche der Proteinsequenz von HP1553 mit Proteinsequenzen von *E. coli* zeigten, dass Homologien zum RecB-Protein bestanden, so dass das *H. pylori*-Gen ebenfalls als *recB* bezeichnet wurde. RecB bildet in *E. coli* zusammen mit den Proteinen RecC und RecD einen Komplex, der die Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA durch Rekombination initiiert (Dillingham und Kowalczykowski, 2008; Kuzminov, 1999; Taylor und Smith, 1995). Die Inaktivierung des *recB*-Gens im *H. pylori*-Stamm 26695 führte zu einem Rückgang der Mutationsfrequenz auf ein Achtel der Frequenz des Wildtyps und die Frequenz Rif-resistenter Klone nach der Inkubation mit Donor-DNA war in der Mutante 26695*recB* um 97% niedriger als im Wildtyp. Diese Reduktion der Frequenz Rif-resistenter Klone nach Inkubation mit Donor-DNA zeigt die wichtige Rolle, die RecB in der Rekombination von *H. pylori* spielt. Der Rückgang der Transformationsfrequenz nach der Inaktivierung des Gens wurde auch kürzlich von einer anderen Gruppe nachgewiesen (Wang und Maier, 2008a). Wang und Maier konnten außerdem zeigen, dass die Mutante sehr empfindlich auf Mitomycin-C-Behandlung reagierte. Mitomycin C ruft Doppelstrangbrüche in der DNA hervor, welche durch rekombinative Reparatur behoben werden. Damit scheint das RecB-Homolog von *H. pylori* eine ähnliche Aufgabe zu erfüllen wie das RecB-Protein in *E. coli*. In einer anderen Studie, die sich ebenfalls mit dem Gen HP1553 beschäftigte, wurde auch eine Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber Mitomycin C nachgewiesen (Amundsen *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Wang und Maier und den in dieser Arbeit ermittelten Werten

beobachteten Marsin *et al.*, dass es durch die Inaktivierung des *recB*-Gens zu einem Anstieg der Transformationsfrequenz kam (Marsin *et al.*, 2008). Dabei wurden die Transformationsexperimente mit homologer genomischer DNA durchgeführt, die als Selektionsmarker eine Streptomycin-Resistenz (hervorgerufen durch eine Punktmutation im Gen *rpsL*) aufwies. Die Bakterien wurden nach der Zugabe der DNA für 24 Stunden auf Festmedium inkubiert und anschließend auf selektive Platten überführt. Diese methodischen Unterschiede, insbesondere die Verwendung homologer DNA, die nur einen Sequenzunterschied (Streptomycin-Resistenz vermittelnde Punktmutation) aufwies, anstelle von homologer Donor-DNA könnten für die Differenzen der Transformationsfrequenzen verantwortlich sein. In der Studie von Marsin *et al.* wurde die *recB*-Mutante auch mit genomischer DNA transformiert, die eine Kanamycin-Resistenz-Kassette als Resistenzmarker trug, was zu keiner Erhöhung der Transformationsfrequenz führte. Ähnlich wie in der *recA*-Mutante könnte auch im Stamm 26695*recB* die niedrigere Mutationsfrequenz durch die Abnahme an Rekombinationsereignissen bedingt sein und somit für eine mutagene Wirkung der Rekombination sprechen.

Trotz der geringen Frequenz Rif-resistenter Klone nach Zugabe von Donor-DNA fand in der Mutante 26695*recB* noch Rekombination statt, so dass es möglich war, die DNA-Importe zu analysieren. Die Länge der importierten Fragmente unterschied sich nicht signifikant von der im Wildtyp gemessenen, so dass die Funktion von RecB in *H. pylori* wahrscheinlich in der Beladung von RecA und der Initiierung der Rekombination liegt, RecB aber wahrscheinlich keine Rolle während des Austauschs der DNA-Stränge spielt. Wie durch Tierexperimente in den Arbeiten von Wang und Maier sowie Amundsen *et al.* gezeigt werden konnte, wird durch die Inaktivierung von *recB* die Kolonisierung des Magens durch *H. pylori* erschwert (Amundsen *et al.*, 2008; Wang und Maier, 2008a), was wahrscheinlich auf dem verminderten Wachstum und auf der höheren Anfälligkeit für DNA-Schädigungen der Mutante beruht.

5.12 RecG, RecN und RecR haben verschiedene regulatorische Funktionen in der homologen Rekombination von *H. pylori*

Neben *recB* spielen auch die Genprodukte von *recG*, *recN* und *recR* eine Rolle in der Initiierung der Rekombination in *E. coli*. Die Inaktivierung der homologen Gene in *H. pylori* zeigte, dass die Enzyme auch in diesem Bakterium die homologe Rekombination maßgeblich

beeinflussen. Der Verlust der Proteine RecG und RecR führte zu einer deutlichen Erhöhung der Frequenzen Rif-resistenter Klone nach Inkubation mit Donor-DNA im *H. pylori*-Stamm 26695, während die RecN-negative Mutante eine niedrigere Frequenz aufwies als der Wildtyp. Die Mutationsfrequenzen blieben in allen drei Mutanten unbeeinflusst.

In *E. coli* hat das RecG-Protein eine wichtige Funktion in der Initiierung und Migration von Holliday-Strukturen an blockierten Replikationsgabeln (Bolt und Lloyd, 2002; McGlynn *et al.*, 2001; McGlynn und Lloyd, 2002) und fördert die Rekombination in den Bakterien. Die limitierende Wirkung des RecG-Proteins auf die Rekombination in *H. pylori* stellt damit einen Gegensatz zu der Situation in *E. coli* dar. Der hyperrekombinante Phänotyp von *H. pylori* *recG*-Mutanten wurde auch von Kang *et al.* beobachtet (Kang *et al.*, 2004). Die Arbeitsgruppe konnte durch die Einführung der aus *E. coli* stammenden Resolvase RusA in eine *H. pylori* *ruvB*-Mutante zeigen, dass die Limitierung der Rekombination durch RecG mit Hilfe dieses Enzyms aufgehoben wurde (Kang und Blaser, 2008). Durch die Inaktivierung des *ruvB*-Gens wurde in dem Experiment die Migration der Holliday-Struktur blockiert, so dass die Wanderung des Rekombinationskreuzes nur noch durch die Aktivität des RecG-Proteins erfolgen konnte, Rekombination also nur noch mit Hilfe von RecG stattfand. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass *recG* in *H. pylori* ein rudimentäres Gen ist und zuvor an einem aus mindestens zwei Schritten bestehenden Mechanismus beteiligt war. Das Protein, welches den zweiten Schritt des Prozesses, die Auflösung der Holliday-Struktur nach Migration durch RecG, katalysierte, ist in *H. pylori* offenbar nicht mehr vorhanden. Der Erhalt des *recG*-Gens in *H. pylori* spricht dafür, dass RecG das Bakterium vor einem zu intensiven genetischen Austausch schützen soll und somit eine andere Funktion hat als in *E. coli*. Die Limitierung der Rekombination wird möglicherweise durch eine kompetitive Hemmung erreicht, indem RecG mit RuvABC um die freie DNA in der Zelle konkurriert, aber den Prozess der Rekombination nicht vollenden kann.

Für *E. coli* ist beschrieben, dass das RecR-Protein an zwei verschiedenen Mechanismen beteiligt ist, die zusammen die Reparatur von Einzelstrang-Lücken in der DNA durch Rekombination regulieren. In Kombination mit RecO vermittelt das RecR-Protein die Kopplung von RecA an einzelsträngige DNA, die mit dem Einzelstrang-DNA bindenden Protein (Ssb) assoziiert ist (Sakai und Cox, 2008). Ein Komplex mit RecF hingegen verhindert die Extension von RecA in den an die Einzelstrang-DNA-Lücke angrenzenden DNA-Doppelstrang (Webb *et al.*, 1997). Inaktivierung von *recR* führt in *E. coli* zu einer Abnahme der Rekombination (Mahdi

und Lloyd, 1989a; Mahdi und Lloyd, 1989b). In *H. pylori* konnte zwar ein RecO-Ortholog identifiziert werden (Marsin *et al.*, 2008), jedoch wurde bisher kein Homolog des RecF-Proteins gefunden. In der Arbeit von Marsin *et al.* wurde auch die Auswirkung einer Inaktivierung des *recR*-Gens auf die homologe Rekombination analysiert. Marsin *et al.* konnten keine signifikante Veränderung der Rekombinationsfrequenzen in den Zellen nach Inkubation mit homologer DNA beobachten, was in starken Kontrast zu den hier dargestellten Ergebnissen steht. Wodurch dieser Unterschied in den Rekombinationsfrequenzen hervorgerufen wird, konnte bisher noch nicht genau geklärt werden. Eine Möglichkeit wäre, dass die Mutante anders auf die von Marsin *et al.* verwendete homologe DNA reagiert, als auf homeologe DNA. Damit könnte RecR am Schutz vor dem Einbau „fremder“ DNA in das Genom beteiligt sein.

Ein drittes Gen, für das eine Beteiligung an der Reparatur von DNA-Brüchen in *E. coli* und anderen Bakterienarten gezeigt wurde, ist *recN* (Finch *et al.*, 1985). In *B. subtilis* wurde RecN gehäuft an Doppelstrangbrüchen der DNA zusammen mit RecO und RecF nachgewiesen (Kidane *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2008) und auch in *Neisseria gonorrhoeae* konnte eine Funktion von RecN in der DNA-Reparatur und Rekombination gezeigt werden (Skaar *et al.*, 2002; Stohl und Seifert, 2006). Die Inaktivierung von *recN* im *H. pylori*-Stamm 26695 führte zu einer um 90% niedrigeren Frequenz Rif-resistenter Klone nach Inkubation mit Donor-DNA als im isogenen Wildtyp-Stamm. Dieser Phänotyp der *recN*-Mutante stimmt mit den Beobachtungen von Wang und Maier überein, die ebenfalls eine Abnahme der Transformationsfrequenzen durch den Verlust eines aktiven RecN-Proteins sowie eine höhere Empfindlichkeit der Mutante gegen Mitomycin C und Sauerstoff feststellten (Wang und Maier, 2008b). Auch bei der *recN*-Mutante zeigte sich, dass Defizite in der rekombinativen Reparatur bei *H. pylori* zu Schwierigkeiten in der Besiedelung des Magens der Maus führten.

In keiner der drei Mutanten, 26695*recG*, 26695*recN* und 26695*recR*, konnte eine Änderung der Länge der importierten DNA-Fragmente beobachtet werden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Proteine zwar an der Initiierung der Rekombination beteiligt sind, aber keinen Einfluss auf den Austausch der DNA-Stränge haben. In Bezug auf die ISR waren keine Unterschiede in der Anzahl im Vergleich zum Wildtyp-Stamm festzustellen. Im Stamm 26695*recR* war die mittlere Länge der sechs ISR (aus 69 Klonen mit Import) allerdings etwa viermal höher als im Wildtyp-Stamm 26695 (signifikant). Warum die Inaktivierung des *recR*-

Gens einen solchen Unterschied in der mittleren Länge der ISR verursacht, konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Da RecR in *E. coli* an der Beladung von ssDNA mit RecA beteiligt ist, wenn diese vom Ssb-Protein geschützt wird (Umezu *et al.*, 1993; Umezu und Kolodner, 1994), könnte es sich bei den längeren ISR um Unterbrechungen während des Strangaustausches handeln. Genauere Untersuchungen der ISR in *recR*-Mutanten sind allerdings noch notwendig, um diese Hypothese zu beweisen.

5.13 Exonuklease VII limitiert die homologe Rekombination

In *H. pylori* sind Homologe für zwei ssDNA-Exonukleasen vorhergesagt. Ein Gen zeigt starke Ähnlichkeit zur Exonuklease RecJ, welche in *E. coli* einzelsträngige DNA vom 5'-Ende aus hydrolysiert (Dianov *et al.*, 1994). Ein zweites Gen, *xseA*, ähnelt der großen Untereinheit der Exonuklease VII von *E. coli*, die einzelsträngige DNA sowohl vom 5'- als auch vom 3'-Ende ausgehend abbauen kann (Vales *et al.*, 1982; Viswanathan und Lovett, 1998). Auch ein Homolog der kleinen Untereinheit *xseB* (HP1482/JHP1375) wurde in den Genomen der *H. pylori*-Stämme 26695 und J99 vorhergesagt. Homologe der ssDNA-Exonukleasen I und X konnten in *H. pylori* nicht gefunden werden.

Die Inaktivierung des Gens *xseA* führte zu einer starken Erhöhung der Frequenz Rif-resistenter Klone nach der Inkubation mit DNA. Im Gegensatz dazu hatte die Unterbrechung des *recJ*-Gens keine Auswirkung auf die Rekombinationsfrequenz. Auch in *E. coli* wurde eine Erhöhung der Rekombinationsfrequenz nach Inaktivierung des Gens *xseA* beobachtet (Chase und Richardson, 1977; Cooper *et al.*, 1993). Der Grund für den Anstieg der Rekombinationsfrequenz könnte die Konkurrenz zwischen den Proteinen, welche die Rekombination durchführen (z.B. RecA) und der Exonuklease VII um die freie einzelsträngige DNA in der Zelle sein, so dass nach Wegfall der Exonuklease VII mehr Substrat für die Rekombination zur Verfügung steht. Der genaue Mechanismus in *H. pylori* ist aber unklar und weitere funktionelle Analysen der Exonukleasen sind notwendig, um genauere Aussagen treffen zu können.

5.14 Glykosylasen erfüllen in *H. pylori* wichtige Aufgaben im Schutz vor Mutationen

Das Basen-Exzisions-System spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von Mutationen im Genom von Bakterien. Das System besteht aus Glykosylasen, die beschädigte Basen aus der DNA entfernen und Apurin- bzw. Apyrimidin-Stellen (AP-Stellen) hinterlassen sowie Endonukleasen, welche die AP-Stelle entfernen und so weitere Abläufe zur Reparatur der DNA ermöglichen. In *H. pylori* sind Homologe der Glykosylasen *magIII*, *mutY*, *nth* und *ung* sowie der Endonukleasen *xth* und *nucT* vorhergesagt worden. Die Untersuchung der Glykosylasen *mutY*, *nth* und *ung* zeigte, dass die Inaktivierung der Gene die Frequenz Rif-Resistenz vermittelnder Punktmutationen im *rpoB*-Gen stark erhöhte. Den stärksten Effekt hatte die Inaktivierung des *mutY*-Gens (siehe Abschnitt 5.2), aber auch die Inaktivierung der Gene *nth* und *ung* führten zu einer signifikanten Erhöhung der Mutationsfrequenzen (neunfach bzw. zweifach). Diese Ergebnisse stimmen gut mit denen anderer Untersuchungen überein, in welchen nach Inaktivierung des *nth*-Gens und des Gens *ung* jeweils ein vierfacher Anstieg der Mutationsfrequenz im Vergleich zum Wildtyp-Stamm gemessen wurde (Huang *et al.*, 2006; O'Rourke *et al.*, 2003). Ein Verlust der Endonuklease Xth führte in den hier durchgeführten Versuchen nicht zu einer Veränderung der Mutationsrate. Huang *et al.* haben in ihren Untersuchungen des Gens *xth* eine zweifache Erhöhung der Mutationsfrequenz nach Inaktivierung des Gens im Stamm JP26 festgestellt (Huang *et al.*, 2006). Da unsere Untersuchungen in einem anderen *H. pylori*-Stamm (26695) durchgeführt wurden, ist es möglich, dass es sich bei den Differenzen um stammspezifische Eigenarten handelt. Die Analysen der Mutationsfrequenzen zeigten, dass die drei Glykosylasen MutY, Nth und Ung wichtige Funktionen im Schutz des Genoms von *H. pylori* vor Veränderungen durch Punktmutationen haben.

5.15 DNA-Glykosylasen beeinflussen die Rekombination in *H. pylori*

Glykosylasen haben ihre Funktion nicht ausschließlich in der Basen-Exzisions-Reparatur sondern spielen auch eine Rolle bei der Rekombination von Bakterien. In einem *E. coli*-System konnte gezeigt werden, dass die Induktion der homologen Rekombination durch das Zellgift Stickstoffmonoxid, aufgrund der Aktivität von Glykosylasen hervorgerufen wird (Spek *et al.*, 2002). Dabei entfernen die Glykosylasen geschädigte Basen aus der DNA und

hinterlassen eine AP-Stelle, die zu einem Doppelstrangbruch in der DNA führen kann. Diese Doppelstrangbrüche werden dann durch homologe Rekombination repariert.

Um zu überprüfen, ob die Glykosylasen MutY, Nth und Ung einen Einfluss auf die Rekombination haben, wurden entsprechende Mutanten des Stammes 26695 mit genomischer DNA des Stammes J99-R3 inkubiert und die Frequenz Rif-resistenter Klone ermittelt. Wie auch in der Studie von Huang *et al.* berichtet (Huang *et al.*, 2006), hatte die Inaktivierung des *ung*-Gens keinen Einfluss auf die Anzahl Rif-resistenter Klone nach der Inkubation mit Donor-DNA. Auch der Verlust von MutY veränderte die Frequenz Rif-resistenter Klone nicht signifikant. Nur in der Mutante 26695*nth* kam es zu einer signifikanten fünffachen Erhöhung der durch Rekombination hervorgerufenen Anzahl an Rif-Resistenzen im Vergleich zum isogenen Wildtyp-Stamm. Neben seiner Glykosylaseaktivität besitzt Nth auch noch eine AP-Lyaseaktivität, die das Rückgrad der DNA auf der 3'-Seite der AP-Stelle hydrolysiert (Wang *et al.*, 2006). Der Wegfall dieser Funktion könnte, wie in *E. coli* beschrieben, zu einer Anhäufung an AP-Stellen in der DNA und dadurch zu einer gesteigerten Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen im Chromosom führen, die eine vermehrte Reparatur durch Rekombination induzieren.

Interessanterweise hatte die Komplementierung der 26695 *mutY*-Mutante mit einem funktionsfähigen *mutY*-Gen zur Folge, dass die Frequenz Rif-resistenter Klone nach der Inkubation mit Donor-DNA um 96% zurückging. Die Überprüfung der Expression des *mutY*-Gens zeigte, dass in den komplementierten Stamm eine deutlich höhere Konzentration an *mutY*-mRNA gebildet wurde als im Wildtyp. Zu der höheren Konzentration an *mutY*-mRNA im Stamm 26695*mutY*comp kam es dadurch, dass das *mutY*-Gen zur Komplementierung unter die Kontrolle des Promotors des *ureA*-Gens gestellt wurde (Huang *et al.*, 2006), was zu einer starken Überexpression des Gens führte. Da ein Effekt der MutY-Glykosylase auf die Frequenz Rif-resistenter Zellen nach der Inkubation mit Donor-DNA nur nach der Überexpression, nicht aber durch eine Inaktivierung des Gens zu beobachten war, könnte die Konzentration von MutY eine entscheidende Rolle während der Rekombination in Wildtyp-Bakterien spielen. Ob sich die Konzentration an MutY auch *in vivo*, z.B. in verschiedenen Wachstumsphasen, verändert, ist bisher noch nicht geklärt. Die Beobachtung, dass die Kompetenz von *H. pylori* in bestimmten Phasen des bakteriellen Wachstums stärker ausgeprägt ist (Baltrus und Guillemín, 2006), zeigt, dass diese Prozesse reguliert sind und würde für diese Hypothese sprechen.

Die Analyse der DNA-Importe Rif-resistenter Klone des Stammes 26695*mutY* zeigte weiterhin, dass die Inaktivierung des *mutY*-Gens eine Verdoppelung der DNA-Importlänge zur Folge hatte. Die Komplementierung des Stammes bewirkte wieder einen Rückgang der Importlänge auf das Niveau des Wildtyps.

5.16 Die Überexpression von *mutY* führt zu einer höheren Anzahl an ISR in der importierten Donor-DNA

Die integrierte Donor-DNA im Stamm 26695*mutY*_{comp} enthielt signifikant mehr ISR als die importierte DNA im Wildtyp-Stamm oder der *mutY*-Mutante. Dieser Effekt der Überexpression von *mutY* könnte durch die gesteigerte Aktivität in der Erkennung von Basenfehlpaarungen in der Heteroduplex-DNA nach der Integration von Donor-DNA durch die MutY-Glykosylase entstehen (Abbildung 26). Auch die niedrigere Frequenz Rif-resistenter Klone nach der Inkubation mit Donor-DNA könnte auf die gesteigerte Korrektur von Fehlpaarungen zurückzuführen sein. Die Rif-Resistenz des Donor-Stammes J99-R3 wird durch eine Punktmutation an Position 1618 im *rpoB*-Gen hervorgerufen, bei der die Basenpaarung C:G durch das Basenpaar T:A ersetzt wurde. Im Stamm 26695 liegt an der Position 1618 das Basenpaar C:G, so dass die Integration eines DNA-Einzelstranges des Stammes J99-R3 an dieser Position entweder zu einer Fehlpaarung zwischen C und A oder T und G kommt. In *E. coli* wurde gezeigt, dass C/A-Fehlpaarungen von der MutY-Glykosylase erkannt werden und der Adeninrest entfernt wird. Diese Aktivität würde in den rekombinanten *H. pylori*-Klonen zur Entfernung der Rif-Resistenz vermittelnden Punktmutation führen und damit die niedrigere Frequenz durch Rekombination hervorgerufener Rif-resistenter Klone nach der Überexpression des *mutY*-Gens erklären. Dass Fehlpaarungen an der Position 1618 von der MutY-Glykosylase besonders gut erkannt und repariert werden können, wurde in den Untersuchungen der Verteilung Rif-Resistenz vermittelnder Punktmutationen im *rpoB*-Gen gezeigt (siehe Abschnitt 5.3). Eine weitere Möglichkeit für die niedrigere Frequenz Rif-resistenter Klone nach der Zugabe von Donor-DNA im Stamm 26695*mutY*_{comp} wäre, dass MutY generell eine suppressive Wirkung auf die Rekombination homeologer DNA hat. Diese Hypothese wird gestärkt durch die Beobachtung, dass durch die Inaktivierung des *mutY*-Gens längere Fragmente der Donor-DNA in das Genom integriert werden. Ein solcher limitierender Effekt in Bezug auf die Länge von Importen heterologer DNA wurde in *Saccharomyces cerevisiae* für das „Mismatch“-Reparatur-System beschrieben und wird auch für *E. coli*

vermutet (Hillers und Stahl, 1999; Li, 2008; Surtees *et al.*, 2004), so dass das Fehlen dieses Systems in *H. pylori* unter anderen durch die Funktion von MutY kompensiert werden könnte. In *E. coli* wurde weiterhin ein Effekt von *mutY* in der Reparatur von Basenfehlpaarung in der DNA beschrieben. Dabei wurden Heteroduplex-Genome des Phagen Lambda untersucht. Die reparierten Abschnitte waren in der Studie kürzer als 27 Nukleotide und länger als neun Nukleotide und erstreckten sich 3'-wärts vom korrigierten Adenin aus gesehen (Radicella *et al.*, 1993). Eine zweite Studie untersuchte die Funktion von *mutY* in einem *E. coli*-Zellextrakt, in dem Heteroduplex-DNA mit einer A/G-Fehlpaarung inkubiert wurde. Die Länge der reparierten Abschnitte wurde dabei mittels des Einbaus radioaktiv markierter Nukleotide ermittelt. Die Analyse ergab, dass die Abschnitte kürzer als zwölf Nukleotide aber länger als fünf Nukleotide waren (Tsai-Wu und Lu, 1994). In den *H. pylori*-Wildtyp-Stämmen war die mittlere Länge der ISR 84 Bp, was die für *E. coli* ermittelten Werte deutlich überschreitet. Die mittlere Länge der ISR in verschiedenen Rezipienten/Donor-Kombinationen variierte von 38 Bp bis 121 Bp (nicht signifikant), so dass davon auszugehen ist, dass die Länge der ISR in *H. pylori* nicht alleine durch MutY bestimmt wird.

MutY ist in *E. coli* in erster Linie für die Reparatur von Fehlpaarungen zwischen 8-OxoG und A verantwortlich. Dabei entfernt es den Adenin-Rest und ermöglicht es so weiteren Reparatursystemen die beschädigte Base (8-OxoG) zu reparieren. Weiterhin konnte in *E. coli* gezeigt werden, dass MutY auch einen Adenin-Rest gegenüber Guanin und Cytosin entfernen kann (Au *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 2003; Tsai-Wu *et al.*, 1992). Nach der Integration von Donor-DNA entstehen an polymorphen Nukleotid-Positionen verschiedene Fehlpaarungen im Heteroduplex-Molekül, die durch den Austausch des aus der Donor-DNA stammenden Nukleotids zu ISR führen. Da zumindest für die MutY-Glykosylase aus *E. coli* gezeigt wurde, dass sie spezifisch für die Hydrolyse des Adenin-Rests ist, wäre eine durch die Funktion von MutY entstandene ISR an das Vorhandensein eines Adenins in der Donor-Sequenz zu erkennen (Abbildung 26). Im Gegensatz dazu könnten in der *mutY*-Mutante keine Adenin-Reste aus der DNA entfernt werden.

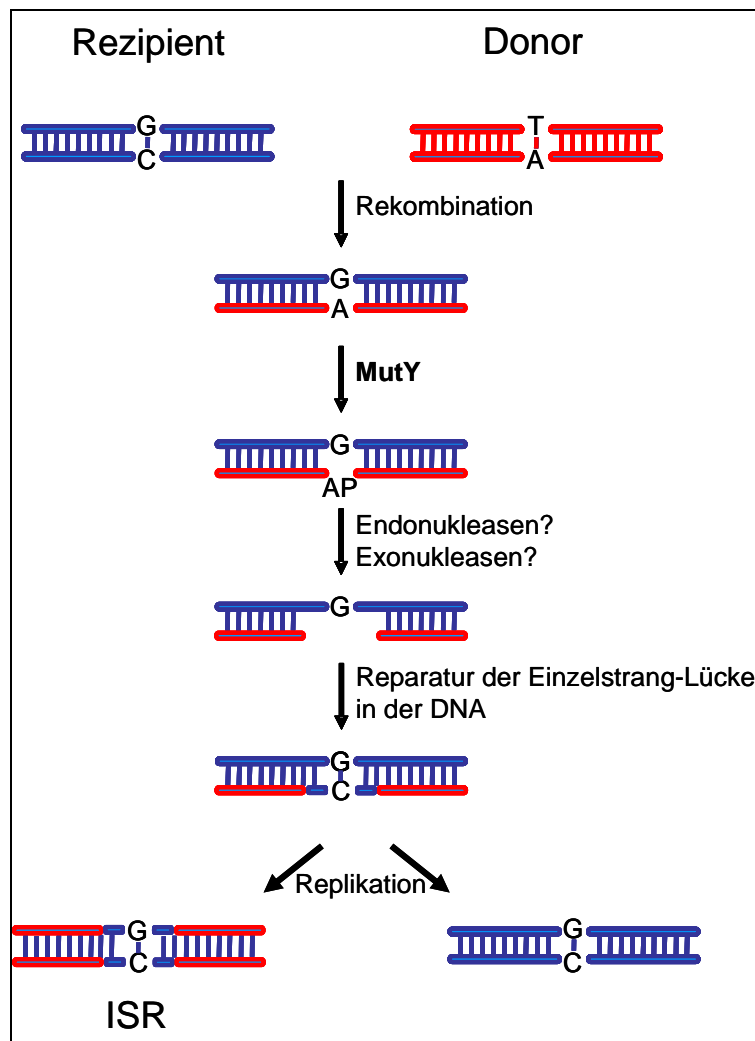


Abbildung 26: Hypothetisches Modell der Bildung von ISR in *H. pylori*

Nach der Rekombination von Donor-DNA (rot) in das Chromosom eines *H. pylori*-Rezipienten-Stammes (blau) befinden sich Basenfehlpaarungen in der Heteroduplex-DNA. Einige der Fehlpaarungen, z.B. G und A sowie C und A, werden von der Glykosylase MutY erkannt. Die Glykosylase hydrolysiert die N-glykosidische Bindung zwischen dem Adeninrest und der Desoxyribose, wodurch eine AP-Stelle in der DNA entsteht. Durch die AP-Stelle werden weitere Prozesse initiiert, die eine Einzelstrang-Lücke in der DNA produzieren. Die Lücke wird mit Hilfe einer Polymerase und der Ligase geschlossen und die Fehlpaarung ist somit behoben. Nach der Replikation des Bakteriums weist eine Tochterzelle in dem betrachteten Bereich die Sequenz des Rezipienten auf, die andere hat die Sequenz des Donor-Stammes, unterbrochen von einem Segment der Rezipienten-Sequenz (ISR).

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die einzelnen ausgetauschten stammspezifischen Nukleotide in ISR von rekombinanten Klonen der Stämme 26695, 26695*mutY* sowie 26695*mutY*comp analysiert. Dabei wurden nur ISR untersucht, in denen nur ein Austausch vorhanden war, um ausschließen zu können, dass noch andere Reparatursysteme an der Bildung der ISR beteiligt waren. Die Analysen der ISR in Sequenzen von Klonen des Stammes 26695*mutY*comp (*mutY*-Überexpression) ergaben, dass besonders häufig Nukleotide an Positionen ausgetauscht wurden, an denen sich in der Rezipienten-Sequenz ein C und in

der Donor-Sequenz ein A gegenüber lagen (27 von 35 Fehlpaarungen, Tabelle 35), gefolgt von Fehlpaarungen, bei denen sich im Heteroduplex-Molekül G und A gegenüber lagen (sechs von 35 Fehlpaarungen, Tabelle 35). Diese Beobachtung spricht für eine Beteiligung der MutY-Glykosylase in der Entstehung von ISR. Die untersuchten ISR der Sequenzen von Rif-resistenten Klonen der Stämme 26695 und 26695*mutY* lassen aufgrund der geringen Datenmenge (weniger als zehn Ereignisse) keine Rückschlüsse auf die Beteiligung von MutY in der Entstehung von ISR zu (Tabelle 35). Außerdem könnten durch den Ausschluss von ISR, die mehr als ein polymorphes Nukleotid enthielten, aus den Analysen, bestimmte Polymorphismen über- oder unterrepräsentiert sein. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die genaue Funktion der Glykosylase MutY in der Entstehung von ISR aufklären zu können.

Die Inaktivierung der Glykosylasen *nth* und *ung* hatte keinen Effekt auf die Länge der DNA-Importe oder deren Mosaikstruktur. Weitere Versuche müssen klären, ob die Überexpression dieser Gene einen ähnlichen Effekt auf die Rekombination hat wie die Überexpression von *mutY*.

Tabelle 35: Anzahl und Art ausgetauschter Nukleotide in ISR der Stämme 26695, 26695*mutY* und 26695*mutYcomp*

Rezipient		26695	26695 <i>mutY</i>	26695 <i>mutYcomp</i>	<i>rpoB</i> -Fragment
Polymorphismus		Anzahl der reparierten Fehlpaarungen in ISR ¹			n _{PS} ²
26695	J99-R3				
T	C	0	3	0	25
C	T	0	2	17	20
G	A	2	1	10	20
A	G	1	0	2	13
A	T	0	1	0	4
G	C	0	0	0	4
C	A	0	0	6	3
A	C	0	0	0	1
C	G	0	0	0	1
T	A	0	0	0	1
T	G	0	0	0	1

1: Untersucht wurden ausschließlich ISR, in denen nur eine Fehlpaarung repariert wurde;

2: n_{PS} = Anzahl der Polymorphismen im sequenzierten *rpoB*-Fragment

5.17 Schlussbetrachtung

Innerhalb dieser Arbeit wurde die DNA-Reparatur und die Rekombination des Humanpathogens *H. pylori* untersucht. Dabei ermöglichte es die Sequenzvielfalt natürlich vorkommender Allele des *rpoB*-Gens und die natürliche Kompetenz des Bakteriums, neben der Mutationsfrequenz auch die Rekombination und deren Produkte genauer zu analysieren. Durch die Analysen konnte aufgedeckt werden, dass die ohnehin schon kurzen DNA-Importe in *H. pylori* noch zusätzlich durch Abschnitte der Rezipienten-Sequenz unterbrochen sind (ISR) und diese Unterbrechungen mit zur hohen allelischen Diversität des Bakteriums beitragen. Bisher konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, ob ISR auch *in vivo* eine Rolle spielen. Größere Studien von sequenziellen Isolaten und Analysen des genetischen Austausches zweier *H. pylori*-Stämme unter definierten Bedingungen im Tiermodell könnten diese Fragen in Zukunft abklären. Dabei werden es die neuen Sequenzierungs-Technologien wie die 454-Technologie (Roche) oder das Solid-System (Applied Biosystems) ermöglichen, große DNA-Fragmente bis hin zu ganzen Genomen zu analysieren. Dadurch kann der genetische Austausch ohne die Verwendung von Selektionsmarkern (z.B. Rif-Resistenz) untersucht werden und damit genauere Aussagen über die Importlänge und die Verteilung von ISR gemacht werden.

Weiterhin wurde mit der Glykosylase MutY ein Protein gefunden, welches für die Regulation der Diversifikation des *H. pylori*-Genoms mit verantwortlich ist. Der Glykosylase kommt nicht nur eine entscheidende Rolle im Schutz gegen Punktmutationen zu, sondern sie ist auch an der Kontrolle der Importlänge und an der Entstehung von ISR beteiligt. Dabei kann das Gen durch Phasenvariation „ein“- bzw. „ausgeschaltet“ werden. Die mit Hilfe des *in vitro*-Transformationssystems ermittelten Ergebnisse zeigten außerdem, dass neben *mutY* noch viele weitere Gene der DNA-Reparatur-Mechanismen sowie Gene der Rekombinationsmaschinerie an der Regulation der genomischen Variabilität von *H. pylori* beteiligt sind.

6 Literatur

- Abastado JP, Cami B, Dinh TH, Igolen J, Kourilsky P (1984) Processing of complex heteroduplexes in *Escherichia coli* and Cos-1 monkey cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 5792-5796.
- Achtman M, Azuma T, Berg DE, Ito Y, Morelli G, Pan ZJ, Suerbaum S, Thompson SA, van der Ende A, van Doorn LJ (1999) Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographic regions. *Mol Microbiol* 32: 459-470.
- Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, Bukanov NO, Drazek ES, Roe BA, Berg DE (1998) Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 28: 37-53.
- Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Berg DE (1992a) PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* 20: 6221-6225.
- Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE (1992b) DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 20: 5137-5142.
- Alm RA, Ling L-SL, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B., Guild BC, deJonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria-Nickelsen M., Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397: 176-180.
- Alonso JC, Stiege AC, Luder G (1993) Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: effect of *recN*, *recF*, *recH* and *addAB* mutations on DNA repair and recombination. *Mol Gen Genet* 239: 129-136.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schaffer AA, Yu YK (2005) Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J* 272: 5101-5109.
- Amundsen SK, Fero J, Hansen LM, Cromie GA, Solnick JV, Smith GR, Salama NR (2008) *Helicobacter pylori* AddAB helicase-nuclease and RecA promote recombination-related DNA repair and survival during stomach colonization. *Mol Microbiol* 69: 994-1007. [MMI6336 \[pii\];10.1111/j.1365-2958.2008.06336.x \[doi\]](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06336.x).
- Andrzejewska J, Lee SK, Olbermann P, Lotzing N, Katzowitsch E, Linz B, Achtman M, Kado CI, Suerbaum S, Josenhans C (2006) Characterization of the pilin ortholog of the *Helicobacter pylori* type IV *cag* pathogenicity apparatus, a surface-associated protein expressed during infection. *J Bacteriol* 188: 5865-5877.
- Appelmelk BJ, Martin SL, Monteiro MA, Clayton CA, McColm AA, Zheng P, Verboom T, Maaskant JJ, van den Eijnden DH, Hokke CH, Perry MB, Vandenbroucke-Grauls CM,

- Kusters JG (1999) Phase variation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide due to changes in the lengths of poly(C) tracts in alpha3-fucosyltransferase genes. *Infect Immun* 67: 5361-5366.
- Appelmelk BJ, Simoons Smit I, Negrini R, Moran AP, Aspinall GO, Forte JG, De Vries T, Quan H, Verboom T, Maaskant JJ, Ghiara P, Kuipers EJ, Bloemena E, Tadema TM, Townsend RR, Tyagarajan K, Crothers JM, Jr., Monteiro MA, Savio A, De Graaff J (1996) Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect Immun* 64: 2031-2040.
- Aras RA, Fischer W, Perez-Perez GI, Crosatti M, Ando T, Haas R, Blaser MJ (2003) Plasticity of repetitive DNA sequences within a bacterial (Type IV) secretion system component. *J Exp Med* 198: 1349-1360.
- Aras RA, Small AJ, Ando T, Blaser MJ (2002) *Helicobacter pylori* interstrain restriction-modification diversity prevents genome subversion by chromosomal DNA from competing strains. *Nucleic Acids Res* 30: 5391-5397.
- Aspinall GO, Monteiro MA (1996) Lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* strains P466 and MO19: structures of the O antigen and core oligosaccharide regions. *Biochemistry* 35: 2498-2504.
- Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL (1995) Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 270: 17771-17777.
- Au KG, Clark S, Miller JH, Modrich P (1989) *Escherichia coli mutY* gene encodes an adenine glycosylase active on G-A mispairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8877-8881.
- Aviles-Jimenez F, Letley DP, Gonzalez-Valencia G, Salama N, Torres J, Atherton JC (2004) Evolution of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin in a human stomach. *J Bacteriol* 186: 5182-5185.
- Backstrom A, Lundberg C, Kersulyte D, Berg DE, Boren T, Arnqvist A (2004) Metastability of *Helicobacter pylori bab* adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16923-16928.
- Baltrus DA, Guillemin K (2006) Multiple phases of competence occur during the *Helicobacter pylori* growth cycle. *FEMS Microbiol Lett* 255: 148-155.
- Banatvala N, Mayo K, Megraud F, Jennings R, Deeks JJ, Feldman RA (1993) The cohort effect and *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis* 168: 219-221.
- Bauerfeind P, Garner R, Dunn BE, Mobley HL (1997) Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut* 40: 25-30.
- Berg DE, Hoffman PS, Appelmelk BJ, Kusters JG (1997) The *Helicobacter pylori* genome sequence: genetic factors for long life in the gastric mucosa. *Trends Microbiol* 5: 468-474.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
- Bjelland S, Bjoras M, Seeberg E (1993) Excision of 3-methylguanine from alkylated DNA by 3-methyladenine DNA glycosylase I of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 21: 2045-2049.

- Bjorkholm B, Lundin A, Sillen A, Guillemin K, Salama N, Rubio C, Gordon JI, Falk P, Engstrand L (2001a) Comparison of genetic divergence and fitness between two subclones of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 69: 7832-7838.
- Bjorkholm B, Sjolund M, Falk PG, Berg OG, Engstrand L, Andersson DI (2001b) Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14607-14612.
- Blaser MJ, Berg DE (2001) *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* 107: 767-773.
- Blaser MJ, Crabtree JE (1996) CagA and the outcome of *Helicobacter pylori* infection [editorial; comment]. *Am J Clin Pathol* 106: 565-567.
- Blattner FR, Plunkett G, III, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1474.
- Bolt EL, Lloyd RG (2002) Substrate specificity of RusA resolvase reveals the DNA structures targeted by RuvAB and *recG* in vivo. *Mol Cell* 10: 187-198.
- Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S (1993) Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 262: 1892-1895.
- Bottcher G (1874) *Dorpauer Medizinische Wochenzeitschrift* 148.
- Bourzac KM, Guillemin K (2005) *Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol* 7: 911-919.
- Brown LM, Thomas TL, Ma JL, Chang YS, You WC, Liu WD, Zhang L, Gail MH (2001) *Helicobacter pylori* infection in rural China: exposure to domestic animals during childhood and adulthood. *Scand J Infect Dis* 33: 686-691.
- Brown LM, Thomas TL, Ma JL, Chang YS, You WC, Liu WD, Zhang L, Pee D, Gail MH (2002) *Helicobacter pylori* infection in rural China: demographic, lifestyle and environmental factors. *Int J Epidemiol* 31: 638-645.
- Cami B, Chambon P, Kourilsky P (1984) Correction of complex heteroduplexes made of mouse H-2 gene sequences in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 503-507.
- Carroll IM, Ahmed N, Beesley SM, Khan AA, Ghousunnissa S, Morain CA, Habibullah CM, Smyth CJ (2004) Microevolution between paired antral and paired antrum and corpus *Helicobacter pylori* isolates recovered from individual patients. *J Med Microbiol* 53: 669-677.
- Casadaban M, Cohen SN (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *E. coli*. *J Mol Biol* 138: 179-207.
- Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A (1996) *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14648-14653.
- Centore RC, Sandler SJ (2007) UvrD limits the number and intensities of *recA*-green fluorescent protein structures in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 189: 2915-2920.

- Chase JW, Richardson CC (1977) *Escherichia coli* mutants deficient in exonuclease VII. J Bacteriol 129: 934-947.
- Chen I, Dubnau D (2004) DNA uptake during bacterial transformation. Nat Rev Microbiol 2: 241-249.
- Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, Cascales E (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type iv secretion systems. Annu Rev Microbiol 59: 451-485.
- Cooper DL, Lahue RS, Modrich P (1993) Methyl-directed mismatch repair is bidirectional. J Biol Chem 268: 11823-11829.
- Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burrone D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N, Rappuoli R (1993) Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 5791-5795.
- Covacci A, Rappuoli R (2000) Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. J Exp Med 191: 587-592.
- Cover TL, Blanke SR (2005) *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. Nat Rev Microbiol 3: 320-332.
- Cover TL, Blaser MJ (1992) Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. J Biol Chem 267: 10570-10575.
- Cover TL, Dooley CP, Blaser MJ (1990) Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. Infect Immun 58: 603-610.
- Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM, Jr. (2003) Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. Cancer Res 63: 951-957.
- Cover TL, Tummuru MKR, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ (1994) Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. J Biol Chem 269: 10566-10573.
- Cox MM (2003) The bacterial *recA* protein as a motor protein. Annu Rev Microbiol 57: 551-577.
- Cox MM (2007) Regulation of bacterial RecA protein function. Crit Rev Biochem Mol Biol 42: 41-63.
- Crabtree JE, Taylor JD, Wyatt JI, Heatley RV, Shallcross TM, Tompkins DS, Rathbone BJ (1991) Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. Lancet 338: 332-335.
- Croxen MA, Sisson G, Melano R, Hoffman PS (2006) The *Helicobacter pylori* chemotaxis receptor TlpB (HP0103) is required for pH taxis and for colonization of the gastric mucosa. J Bacteriol 188: 2656-2665.
- Daugule I, Rowland M (2008) *Helicobacter pylori* infection in children. Helicobacter 13 Suppl 1: 41-46.
- David SS, O'Shea VL, Kundu S (2007) Base-excision repair of oxidative DNA damage. Nature 447: 941-950.

- David SS, Williams SD (1998) Chemistry of glycosylases and endonucleases Involved in base-excision repair. *Chem Rev* 98: 1221-1262.
- Demple B, Harrison L (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 63: 915-948.
- Dianov G, Sedgwick B, Daly G, Olsson M, Lovett S, Lindahl T (1994) Release of 5'-terminal deoxyribose-phosphate residues from incised abasic sites in DNA by the *Escherichia coli* RecJ protein. *Nucleic Acids Res* 22: 993-998.
- Dillingham MS, Kowalczykowski SC (2008) RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 642-71, Table.
- Doig P, de Jonge BL, Alm RA, Brown ED, Uria-Nickelsen M, Noonan B, Mills SD, Tummino P, Carmel G, Guild BC, Moir DT, Vovis GF, Trust TJ (1999) *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 675-707.
- Doig P, Exner MM, Hancock RE, Trust TJ (1995) Isolation and characterization of a conserved porin protein from *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 177: 5447-5452.
- Dooley CP, Cohen H, Fitzgibbons PL, Bauer M, Appleman MD, Perez-Perez GI, Blaser MJ (1989) Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N Engl J Med* 321: 1562-1566.
- Dore MP, Sepulveda AR, El-Zimaity H, Yamaoka Y, Osato MS, Mototsugu K, Nieddu AM, Realdi G, Graham DY (2001) Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep-implications for transmission to humans. *Am J Gastroenterol* 96: 1396-1401.
- Dubnau D (1999) DNA uptake in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 53: 217-244.
- Dunn BE, Campbell GP, Perez-Perez GI, Blaser MJ (1990) Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 265: 9464-9469.
- Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ (1997) *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 10: 720-741.
- Dutra BE, Sutra VA, Jr., Lovett ST (2007) *recA*-independent recombination is efficient but limited by exonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 216-221.
- Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S (1991) Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 59: 2470-2475.
- Eaton KA, Dewhirst FE, Radin MJ, Fox JG, Paster BJ, Krakowka S, Morgan DR (1993) *Helicobacter acinonyx* sp. nov., isolated from cheetahs with gastritis. *Int J Syst Bacteriol* 43: 99-106.
- Eaton KA, Krakowka S (1994) Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 62: 3604-3607.
- Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S (1996) Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun* 64: 2445-2448.
- Eisen JA (1998) A phylogenomic study of the MutS family of proteins. *Nucleic Acids Res* 26: 4291-4300.
- Enright MC, Spratt BG (1999) Extensive variation in the *ddl* gene of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* results from a hitchhiking effect driven by the penicillin-binding protein 2b gene. *Mol Biol Evol* 16: 1687-1695.

- Ernst PB, Gold BD (2000) The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol* 54: 615-640.
- Eutsey R, Wang G, Maier RJ (2007) Role of a *mutY* DNA glycosylase in combating oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*. *DNA Repair (Amst)* 6: 19-26.
- Falush D, Kraft C, Correa P, Taylor NS, Fox JG, Achtman M, Suerbaum S (2001) Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: Estimates of clock rates, recombination size and minimal age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15056-15061.
- Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Megraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M, Suerbaum S (2003) Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 299: 1582-1585.
- Fearnhead P, Smith NG, Barrigas M, Fox A, French N (2005) Analysis of recombination in *Campylobacter jejuni* from MLST population data. *J Mol Evol* 61: 333-340.
- Feldman RA (2001) Epidemiologic observations and open questions about disease and infection caused by *Helicobacter pylori*. In: Achtman M, Suerbaum S, editors. *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology. Wymondham: Horizon Scientific Press. pp. 29-51.
- Ferrero RL, Cussac V, Courcoux P, Labigne A (1992) Construction of isogenic urease-negative mutants of *Helicobacter pylori* by allelic exchange. *J Bacteriol* 174: 4212-4217.
- Finch PW, Chambers P, Emmerson PT (1985) Identification of the *Escherichia coli recN* gene product as a major SOS protein. *J Bacteriol* 164: 653-658.
- Finlay BB, Falkow S (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 136-169.
- Fischer W, Haas R (2004) The RecA protein of *Helicobacter pylori* requires a posttranslational modification for full activity. *J Bacteriol* 186: 777-784.
- Fischer W, Hofreuter D, Haas R (2001a) Natural transformation, recombination and repair. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington, D.C.: ASM Press.
- Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R (2001b) Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* 42: 1337-1348.
- Fornili SL, Fox MS (1977) Electron microscope visualization of the products of *Bacillus subtilis* transformation. *J Mol Biol* 113: 181-191.
- Fox JG (2002) The non-*H. pylori* *Helicobacters*: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut* 50: 273-283.
- Fox JG, Cabot EB, Taylor NS, Laraway R (1988) Gastric colonization by *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* in ferrets. *Infect Immun* 56: 2994-2996.

- Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS, Collins MJJ, Gorelick PL, Ward JM (1994) *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. J Clin Microbiol 32: 1238-1245.
- Fung WP, Papadimitriou JM, Matz LR (1979) Endoscopic, histological and ultrastructural correlations in chronic gastritis. Am J Gastroenterol 71: 269-279.
- Furuta T, Soya Y, Sugimoto M, Shirai N, Nakamura A, Kodaira C, Nishino M, Okuda M, Okimoto T, Murakami K, Fujioka T, Hishida A (2007) Modified allele-specific primer-polymerase chain reaction method for analysis of susceptibility of *Helicobacter pylori* strains to clarithromycin. J Gastroenterol Hepatol 22: 1810-1815.
- Galmiche A, Rassow J, Doye A, Cagnol S, Chambard JC, Contamin S, de T, V, Just I, Ricci V, Solcia E, Van Obberghen E, Boquet P (2000) The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. EMBO J 19: 6361-6370.
- Gariyban L, Huang T, Kim M, Wolff E, Nguyen A, Nguyen T, Diep A, Hu K, Iverson A, Yang H, Miller JH (2003) Use of the *rpoB* gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome. DNA Repair (Amst) 2: 593-608.
- Ge Z, Hiratsuka K, Taylor DE (1995) Nucleotide sequence and mutational analysis indicate that two *Helicobacter pylori* genes encode a P-type ATPase and a cation-binding protein associated with copper transport. Mol Microbiol 15: 97-106.
- Ge Z, Sterzenbach T, Whary MT, Rickman BH, Rogers AB, Shen Z, Taylor NS, Schauer DB, Josenhans C, Suerbaum S, Fox JG (2008) *Helicobacter hepaticus* HHG11 is a pathogenicity island associated with typhlocolitis in B6.129-IL10 tm1Cgn mice. Microbes Infect 10: 726-733.
- Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R (2003) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. Science 301: 1099-1102.
- Geis G, Suerbaum S, Forsthoff B, Leying H, Opferkuch W (1993) Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol 38: 371-377.
- Go MF, Graham DY (1996) Presence of the *cagA* gene in the majority of *Helicobacter pylori* strains is independent of whether the individual has duodenal ulcer or asymptomatic gastritis. Helicobacter 1: 107-111.
- Goodman SN (1999) Toward evidence-based medical statistics. 2: The Bayes factor. Ann Intern Med 130: 1005-1013.
- Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper WES (1989) Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. Int J Syst Bacteriol 39: 397-405.
- Granstrom M, Lehours P, Bengtsson C, Megraud F (2008) Diagnosis of *Helicobacter pylori*. Helicobacter 13 Suppl 1: 7-12.
- Gressmann H, Linz B, Ghai R, Pleissner K-P, Schlapbach R, Yamaoka Y, Kraft C, Suerbaum S, Meyer TF, Achtman M (2005) Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. PLoS Genet 1: e43.

- Guan Y, Manuel RC, Arvai AS, Parikh SS, Mol CD, Miller JH, Lloyd S, Tainer JA (1998) *mutY* catalytic core, mutant and bound adenine structures define specificity for DNA repair enzyme superfamily. *Nat Struct Biol* 5: 1058-1064.
- Guild WR, Cato A, Jr., Lacks S (1968) Transformation and DNA size: two controlling parameters and the efficiency of the single strand intermediate. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 33: 643-645.
- Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, Tschäpe H (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* 23: 1089-1097.
- Hallet B (2001) Playing Dr Jekyll and Mr Hyde: combined mechanisms of phase variation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4: 570-581.
- Hamlet A, Thoreson AC, Nilsson O, Svennerholm AM, Olbe L (1999) Duodenal *Helicobacter pylori* infection differs in *cagA* genotype between asymptomatic subjects and patients with duodenal ulcers. *Gastroenterology* 116: 259-268.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Hasegawa K, Yoshiyama K, Maki H (2008) Spontaneous mutagenesis associated with nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Genes Cells* 13: 459-469.
- Hatakeyama M (2004) Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer* 4: 688-694.
- Hatakeyama M (2008) SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 11: 30-37.
- Hawtin PR, Stacey AR, Newell DG (1990) Investigation of the structure and localization of the urease of *Helicobacter pylori* using monoclonal antibodies. *J Gen Microbiol* 136: 1995-2000.
- Heep M, Beck D, Bayerdorffer E, Lehn N (1999) Rifampin and rifabutin resistance mechanism in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1497-1499.
- Heep M, Odenbreit S, Beck D, Decker J, Prohaska E, Rieger U, Lehn N (2000a) Mutations at four distinct regions of the *rpoB* gene can reduce the susceptibility of *Helicobacter pylori* to rifamycins. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1713-1715.
- Heep M, Rieger U, Beck D, Lehn N (2000b) Mutations in the beginning of the *rpoB* gene can induce resistance to rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1075-1077.
- Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, Hatakeyama M (2002) Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14428-14433.
- Hill RF (1958) A radiation-sensitive mutant of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 30: 636-637.
- Hillers KJ, Stahl FW (1999) The conversion gradient at HIS4 of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Heteroduplex rejection and restoration of Mendelian segregation. *Genetics* 153: 555-572.

- Hofreuter D, Karnholz A, Haas R (2003) Topology and membrane interaction of *Helicobacter pylori* ComB proteins involved in natural transformation competence. *Int J Med Microbiol* 293: 153-165.
- Hofreuter D, Odenbreit S, Haas R (2001) Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol Microbiol* 41: 379-391.
- Hofreuter D, Odenbreit S, Henke G, Haas R (1998) Natural competence for DNA transformation in *Helicobacter pylori*: identification and genetic characterization of the *comB* locus. *Mol Microbiol* 28: 1027-1038.
- Holliday R (1964) Mechanism for gene conversion in fungi. *Genet Res* 5: 282-304.
- Horst JP, Wu TH, Marinus MG (1999) *Escherichia coli* mutator genes. *Trends Microbiol* 7: 29-36.
- Howard-Flanders P, Boyce RP, Simson E, Theriot L (1962) A genetic locus in *E. coli* K12 that controls the reactivation of UV-photoproducts associated with thymine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48: 2109-2115.
- Howard-Flanders P, Theriot L (1962) A method for selecting radiation-sensitive mutants of *Escherichia coli*. *Genetics* 47: 1219-1224.
- Hu LT, Mobley HL (1990) Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 58: 992-998.
- Huang S, Kang J, Blaser MJ (2006) Antimutator role of the DNA glycosylase *mutY* gene in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 188: 6224-6234.
- Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Boren T (1998) *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histoblood group antigens revealed by retagging. *Science* 279: 373-377.
- Israel DA, Salama N, Krishna U, Rieger UM, Atherton JC, Falkow S, Peek RMJ (2001) *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14625-14630.
- Jaworski W (1899) Podrecznik Chorob zoladka (Handbuch der gastrischen Erkrankungen). Wydawnictwa Dziel Lakarskich Polskich 30-47.
- Jeffreys, H. (12-11-1961) Theory of probability. Oxford University Press, USA.
- Josenhans C, Eaton KA, Thevenot T, Suerbaum S (2000) Switching of flagellar motility in *Helicobacter pylori* by reversible length variation of a short homopolymeric sequence repeat in *flhP*, a gene encoding a basal body protein. *Infect Immun* 68: 4598-4603.
- Josenhans C, Labigne A, Suerbaum S (1995) Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: Both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J Bacteriol* 177: 3010-3020.
- Josenhans C, Suerbaum S (2001) Motility and chemotaxis. In: Achtman M, Suerbaum S, editors. *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology. Wymondham: Horizon Scientific Press. pp. 171-184.
- Kang J, Blaser MJ (2006a) Bacterial populations as perfect gases: genomic integrity and diversification tensions in *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol* 4: 826-836.

- Kang J, Blaser MJ (2006b) UvrD helicase suppresses recombination and DNA damage-induced deletions. *J Bacteriol* 188: 5450-5459.
- Kang J, Blaser MJ (2008) Repair and Anti-Repair DNA helicases in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* .
- Kang J, Huang S, Blaser MJ (2005) Structural and functional divergence of MutS2 from bacterial MutS1 and eukaryotic MSH4-MSH5 homologs. *J Bacteriol* 187: 3528-3537.
- Kang J, Tavakoli D, Tschumi A, Aras RA, Blaser MJ (2004) Effect of host species on *recG* phenotypes in *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186: 7704-7713.
- Kansau I, Raymond J, Bingen E, Courcoux P, Kalach N, Bergeret M, Braimi N, Dupont C, Labigne A (1996) Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. *Res Microbiol* 147: 661-669.
- Karnholz A, Hoefler C, Odenbreit S, Fischer W, Hofreuter D, Haas R (2006) Functional and topological characterization of novel components of the *comB* DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 188: 882-893.
- Kass R, Raftery A (1995) Bayes factors. *J Am Stat Assoc* 90: 773-795.
- Kelly DJ (1998) The physiology and metabolism of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Adv Microb Physiol* 40:137-89: 137-189.
- Kersulyte D, Chalkauskas H, Berg DE (1999) Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol Microbiol* 31: 31-43.
- Kidane D, Sanchez H, Alonso JC, Graumann PL (2004) Visualization of DNA double-strand break repair in live bacteria reveals dynamic recruitment of *Bacillus subtilis* RecF, RecO and *recN* proteins to distinct sites on the nucleoids. *Mol Microbiol* 52: 1627-1639.
- Kim M, Huang T, Miller JH (2003) Competition between MutY and mismatch repair at A x C mispairs In vivo. *J Bacteriol* 185: 4626-4629.
- Kong H, Lin LF, Porter N, Stickel S, Byrd D, Posfai J, Roberts RJ (2000) Functional analysis of putative restriction-modification system genes in the *Helicobacter pylori* J99 genome. *Nucleic Acids Res* 28: 3216-3223.
- Konturek JW (2003) Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. *J Physiol Pharmacol* 54: 23-41.
- Kostrzynska M, Betts JD, Austin JW, Trust TJ (1991) Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. *J Bacteriol* 173: 937-946.
- Kowalczykowski SC (2000) Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci* 25: 156-165.
- Kowalczykowski SC, Dixon DA, Eggleston AK, Lauder SD, Rehrauer WM (1994) Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 58: 401-465.
- Kraft, C. (2004) Die Rolle von Mutation und Rekombination in der Mikroevolution von *Helicobacter pylori* [Dissertation]. Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg. 141 p.

- Kraft C, Stack A, Josenhans C, Niehus E, Dietrich G, Correa P, Fox JG, Falush D, Suerbaum S (2006) Genomic changes during chronic *Helicobacter pylori* infection. *J Bacteriol* 188: 249-254.
- Kraft C, Suerbaum S (2005) Mutation and recombination in *Helicobacter pylori*: Mechanisms and role in generating strain diversity. *Int J Med Microbiol* 295: 299-305.
- Krokan HE, Standal R, Slupphaug G (1997) DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J* 325 (Pt 1): 1-16.
- Kuipers EJ (1999) Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 13 Suppl 1:3-11: 3-11.
- Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ (1995) *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J Natl Cancer Inst* 87: 1777-1780.
- Kulick S, Moccia C, Didelot X, Falush D, Kraft C, Suerbaum S (2008a) Mosaic DNA imports with interspersions of recipient sequence after natural transformation of *Helicobacter pylori*. *PLoS ONE* 3: e3797.
- Kulick S, Moccia C, Kraft C, Suerbaum S (2008b) The *Helicobacter pylori* *mutY* homologue HP0142 is an antimutator gene that prevents specific C to A transversions. *Arch Microbiol* 189: 263-270.
- Kusters JG, Gerrits MM, Van-Strijp JA, Vandenbroucke-Grauls CMJE (1997) Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestations of cell death. *Infect Immun* 65: 3672-3679.
- Kuzminov A (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 751-813.
- Labigne-Roussel A, Courcoux P, Tompkins L (1988) Gene disruption and replacement as a feasible approach for mutagenesis of *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 170: 1704-1708.
- Lahue RS, Au KG, Modrich P (1989) DNA mismatch correction in a defined system. *Science* 245: 160-164.
- Langenberg W, Rauws EA, Widjojokusumo A, Tytgat GN, Zanen HC (1986) Identification of *Campylobacter pyloridis* isolates by restriction endonuclease DNA analysis. *J Clin Microbiol* 24: 414-417.
- Lee A, Hazell SL, O'Rourke J, Kouprach S (1988) Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infect Immun* 56: 2843-2850.
- Lepper PM, Triantafilou M, Schumann C, Schneider EM, Triantafilou K (2005) Lipopolysaccharides from *Helicobacter pylori* can act as antagonists for Toll-like receptor 4. *Cell Microbiol* 7: 519-528.
- Leung WK, Siu KL, Kwok CK, Chan SY, Sung R, Sung JJ (1999) Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission. *Am J Gastroenterol* 94: 2881-2884.
- Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR (1988) Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* 26: 93-99.
- Levine SM, Lin EA, Emara W, Kang J, DiBenedetto M, Ando T, Falush D, Blaser MJ (2007) Plastic cells and populations: DNA substrate characteristics in *Helicobacter pylori*

- transformation define a flexible but conservative system for genomic variation. *FASEB J* 21: 3458-3467.
- Li GM (2008) Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 18: 85-98.
- Lin LF, Posfai J, Roberts RJ, Kong H (2001) Comparative genomics of the restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2740-2745.
- Linz B, Balloux F, Moodley Y, Hua L, Manica A, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, Achtman M (2007) An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445: 915-918.
- Linz B, Schenker M, Zhu P, Achtman M (2000) Frequent interspecific genetic exchange between commensal *Neisseriae* and *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 36: 1049-1058.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4: 357-362.
- Loughlin MF, Barnard FM, Jenkins D, Sharples GJ, Jenks PJ (2003) *Helicobacter pylori* mutants defective in *ruvC* Holliday junction resolvase display reduced macrophage survival and spontaneous clearance from the murine gastric mucosa. *Infect Immun* 71: 2022-2031.
- Magni GE, Von Borstel RC (1962) Different Rates of Spontaneous Mutation during Mitosis and Meiosis in Yeast. *Genetics* 47: 1097-1108.
- Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Angstrom J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S, Wadstrom T, Kersulyte D, Berg DE, Dubois A, Petersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB, Arnqvist A, Hammarstrom L, Boren T (2002) *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 297: 573-578.
- Mahdi AA, Lloyd RG (1989a) Identification of the *recR* locus of *Escherichia coli* K-12 and analysis of its role in recombination and DNA repair. *Mol Gen Genet* 216: 503-510.
- Mahdi AA, Lloyd RG (1989b) The *recR* locus of *Escherichia coli* K-12: molecular cloning, DNA sequencing and identification of the gene product. *Nucleic Acids Res* 17: 6781-6794.
- Majewski SI, Goodwin CS (1988) Restriction endonuclease analysis of the genome of *Campylobacter pylori* with a rapid extraction method: evidence for considerable genomic variation. *J Infect Dis* 157: 465-471.
- Malaty HM, Graham DY (1994) Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 35: 742-745.
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, el-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ (2007) Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 56: 772-781.
- Marais A, Mendz GL, Hazell SL, Megraud F (1999) Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 642-674.

- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Geer LY, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH (2005) CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* 33: D192-D196.
- Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ (1985) Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust* 142: 436-439.
- Marshall BJ, Goodwin CS (1987) Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int J Syst Bacteriol* 37: 68.
- Marshall BJ, Warren JR (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311-1315.
- Marsin S, Mathieu A, Kortulewski T, Guerois R, Radicella JP (2008) Unveiling novel RecO distant orthologues involved in homologous recombination. *PLoS Genet* 4: e1000146.
- Mathieu A, O'Rourke EJ, Radicella JP (2006) *Helicobacter pylori* genes involved in avoidance of mutations induced by 8-oxoguanine. *J Bacteriol* 188: 7464-7469.
- Maynard SJ, Smith NH (1998) Detecting recombination from gene trees. *Mol Biol Evol* 15: 590-599.
- McColl KE (1997) *Helicobacter pylori* and acid secretion: where are we now? [comment]. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9: 333-335.
- McGlynn P, Lloyd RG (1999) *recG* helicase activity at three- and four-strand DNA structures. *Nucleic Acids Res* 27: 3049-3056.
- McGlynn P, Lloyd RG (2001) Rescue of stalled replication forks by *recG*: simultaneous translocation on the leading and lagging strand templates supports an active DNA unwinding model of fork reversal and Holliday junction formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8227-8234.
- McGlynn P, Lloyd RG (2002) Genome stability and the processing of damaged replication forks by *recG*. *Trends Genet* 18: 413-419.
- McGlynn P, Lloyd RG, Marians KJ (2001) Formation of Holliday junctions by regression of nascent DNA in intermediates containing stalled replication forks: *recG* stimulates regression even when the DNA is negatively supercoiled. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8235-8240.
- McKane M, Milkman R (1995) Transduction, restriction and recombination patterns in *Escherichia coli*. *Genetics* 139: 35-43.
- Meddows TR, Savory AP, Grove JI, Moore T, Lloyd RG (2005) RecN protein and transcription factor DksA combine to promote faithful recombinational repair of DNA double-strand breaks. *Mol Microbiol* 57: 97-110.
- Messer W, Noyer-Weidner M (1988) Timing and targeting: the biological functions of Dam methylation in *E. coli*. *Cell* 54: 735-737.
- Michaels ML, Miller JH (1992) The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J Bacteriol* 174: 6321-6325.

- Michaels ML, Tchou J, Grollman AP, Miller JH (1992) A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. *Biochemistry* 31: 10964-10968.
- Miller JH (1996) Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annu Rev Microbiol* 50: 625-643.
- Modrich P, Lahue R (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 65: 101-133.
- Montecucco C, De Bernard M (2003) Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes Infect* 5: 715-721.
- Monteiro MA, Chan KH, Rasko DA, Taylor DE, Zheng PY, Appelmek BJ, Wirth HP, Yang M, Blaser MJ, Hynes SO, Moran AP, Perry MB (1998) Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. Molecular mimicry between *H. pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. *J Biol Chem* 273: 11533-11543.
- Morris A, Nicholson G (1987) Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am J Gastroenterol* 82: 192-199.
- Muotiala A, Helander IM, Pyhala L, Kosunen TU, Moran AP (1992) Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 60: 1714-1716.
- Naumann M (2005) Pathogenicity island-dependent effects of *Helicobacter pylori* on intracellular signal transduction in epithelial cells. *Int J Med Microbiol* 1: 1.
- Nedenskov P (1994) Nutritional requirements for growth of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* 60: 3450-3453.
- Nedenskov-Sorensen P, Bukholm G, Bovre K (1990) Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori* [letter]. *J Infect Dis* 161: 365-366.
- Nguyen LT, Uchida T, Murakami K, Fujioka T, Moriyama M (2008) *Helicobacter pylori* virulence and the diversity of gastric cancer in Asia. *J Med Microbiol* 57: 1445-1453.
- Nilsson C, Skoglund A, Moran AP, Annuk H, Engstrand L, Normark S (2006) An enzymatic ruler modulates Lewis antigen glycosylation of *Helicobacter pylori* LPS during persistent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Nilsson C, Skoglund A, Moran AP, Annuk H, Engstrand L, Normark S (2008) Lipopolysaccharide diversity evolving in *Helicobacter pylori* communities through genetic modifications in fucosyltransferases. *PLoS ONE* 3: e3811.
- O'Rourke EJ, Chevalier C, Boiteux S, Labigne A, Ielpi L, Radicella JP (2000) A novel 3-methyladenine DNA glycosylase from *Helicobacter pylori* defines a new class within the endonuclease III family of base excision repair glycosylases. *J Biol Chem* 275: 20077-20083.
- O'Rourke EJ, Chevalier C, Pinto AV, Thiberge JM, Ielpi L, Labigne A, Radicella JP (2003) Pathogen DNA as target for host-generated oxidative stress: role for repair of bacterial DNA damage in *Helicobacter pylori* colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2789-2794.
- O'Rourke EJ, Pinto AV, Petroni EA, Tolmasky ME, Ielpi L (2004) Evidence for the active role of a novel nuclease from *Helicobacter pylori* in the horizontal transfer of genetic information. *J Bacteriol* 186: 2586-2593.

- Odenbreit S, Püls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287: 1497-1500.
- Ogura K, Maeda S, Nakao M, Watanabe T, Tada M, Kyutoku T, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M (2000) Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J Exp Med* 192: 1601-1610.
- Oh JD, Kling-Backhed H, Giannakis M, Xu J, Fulton RS, Fulton LA, Cordum HS, Wang C, Elliott G, Edwards J, Mardis ER, Engstrand LG, Gordon JI (2006) The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9999-10004.
- Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, Higashi H, Musashi M, Iwabuchi K, Suzuki M, Yamada G, Azuma T, Hatakeyama M (2008) Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1003-1008.
- Ota H, Katsuyama T, Nakajima S, El-Zimaity H, Kim JG, Graham DY, Genta RM (1998) Intestinal metaplasia with adherent *Helicobacter pylori*: a hybrid epithelium with both gastric and intestinal features. *Hum Pathol* 29: 846-850.
- Otterlei M, Kavli B, Standal R, Skjelbred C, Bharati S, Krokan HE (2000) Repair of chromosomal abasic sites *in vivo* involves at least three different repair pathways. *EMBO J* 19: 5542-5551.
- Parsonnet J (1995) The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 9 Suppl 2: 45-51.
- Parsonnet J, Shmueli H, Haggerty T (1999) Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA* 282: 2240-2245.
- Peck B, Ortkamp M, Diehl KD, Hundt E, Knapp B (1999) Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* 27: 3325-3333.
- Picksley SM, Attfield PV, Lloyd RG (1984) Repair of DNA double-strand breaks in *Escherichia coli* K12 requires a functional *recN* product. *Mol Gen Genet* 195: 267-274.
- Pinto AV, Mathieu A, Marsin S, Veaute X, Ielpi L, Labigne A, Radicella JP (2005) Suppression of homologous and homeologous recombination by the bacterial MutS2 protein. *Mol Cell* 17: 113-120.
- Poppe M, Feller SM, Romer G, Wessler S (2006) Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene* .
- Pounder RE, Ng D (1995) The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* 9 Suppl 2: 33-39.
- Radicella JP, Clark EA, Chen S, Fox MS (1993) Patch length of localized repair events: role of DNA polymerase I in *mutY*-dependent mismatch repair. *J Bacteriol* 175: 7732-7736.
- Raposa S, Fox MS (1987) Some features of base pair mismatch and heterology repair in *Escherichia coli*. *Genetics* 117: 381-390.

- Raymond J, Thiberge JM, Chevalier C, Kalach N, Bergeret M, Labigne A, Dauga C (2004) Genetic and transmission analysis of *Helicobacter pylori* strains within a family. *Emerg Infect Dis* 10: 1816-1821.
- Reynolds DJ, Penn CW (1994) Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. *J Gen Microbiol* 140: 2649-2656.
- Reynolds MG (2000) Compensatory evolution in rifampin-resistant *Escherichia coli*. *Genetics* 156: 1471-1481.
- Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh HM, Atherton JC (2007) A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 133: 926-936.
- Rieder G, Fischer W, Haas R (2005) Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. *Curr Opin Microbiol* 8: 67-73.
- Robinson K, Loughlin MF, Potter R, Jenks PJ (2005) Host adaptation and immune modulation are mediated by homologous recombination in *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis* 191: 579-587.
- Rohde M, Puls J, Buhrdorf R, Fischer W, Haas R (2003) A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* *cag* type IV secretion system. *Mol Microbiol* 49: 219-234.
- Rowland M, Daly L, Vaughan M, Higgins A, Bourke B, Drumm B (2006) Age-specific incidence of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 130: 65-72.
- Rowland M, Imrie C, Bourke B, Drumm B (1999) How should *Helicobacter pylori* infected children be managed? *Gut* 45 Suppl 1:I36-9: I36-I39.
- Sachs G, Weeks DL, Melchers K, Scott DR (2003) The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Physiol* 65: 349-369.
- Sakai A, Cox MM (2008) RecFOR and RecOR as distinct RecA loading pathways. *J Biol Chem* .
- Salama N, Guillemin K, McDaniel TK, Sherlock G, Tompkins L, Falkow S (2000) A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 14668-14673.
- Salaun L, Linz B, Suerbaum S, Saunders NJ (2004) The diversity within an expanded and redefined repertoire of phase-variable genes in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 150: 817-830.
- Sambrook, J. and Russell, D. G. (2004) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez AM, Volk DE, Gorenstein DG, Lloyd RS (2003) Initiation of repair of A/G mismatches is modulated by sequence context. *DNA Repair (Amst)* 2: 863-878.
- Sanchez H, Cardenas PP, Yoshimura SH, Takeyasu K, Alonso JC (2008) Dynamic structures of *Bacillus subtilis* *recN*-DNA complexes. *Nucleic Acids Res* 36: 110-120.
- Sanchez H, Kidane D, Castillo CM, Graumann PL, Alonso JC (2006) Recruitment of *Bacillus subtilis* *recN* to DNA double-strand breaks in the absence of DNA end processing. *J Bacteriol* 188: 353-360.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- Saunders NJ, Peden JF, Moxon ER (1999) Absence in *Helicobacter pylori* of an uptake sequence for enhancing uptake of homospecific DNA during transformation. *Microbiology* 145: 3523-3528.
- Schmitt W, Odenbreit S, Heuermann D, Haas R (1995) Cloning of the *Helicobacter pylori* *recA* gene and functional characterization of its product. *Mol Gen Genet* 248: 563-572.
- Schmitz A, Josenhans C, Suerbaum S (1997) Cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* *flbA* gene, which codes for a membrane protein involved in coordinated expression of flagellar genes. *J Bacteriol* 179: 987-997.
- Schofield MJ, Hsieh P (2003) DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol* 57: 579-608.
- Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling HO, Josenhans C, Suerbaum S (2004) The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5024-5029.
- Schreiber S, Nguyen TH, Stuben M, Scheid P (2000) Demonstration of a pH gradient in the gastric gland of the acid-secreting guinea pig mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G597-G604.
- Schwarz G (1978) Estimating the dimension of a model. *Ann Stat* 6: 461-464.
- Schwarz S, Morelli G, Kusecek B, Manica A, Balloux F, Owen RJ, Graham DY, van der Merwe S, Achtman M, Suerbaum S (2008) Horizontal versus familial transmission of *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog* 4: e1000180.
- Schweinitzer T, Mizote T, Ishikawa N, Dudnik A, Inatsu S, Schreiber S, Suerbaum S, Aizawa S, Josenhans C (2008) Functional characterization and mutagenesis of the proposed behavioral sensor TlpD of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 190: 3244-3255.
- Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, Sachs G (2002) Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 123: 187-195.
- Sisco KL, Smith HO (1979) Sequence-specific DNA uptake in *Haemophilus* transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 972-976.
- Skaar EP, Lazio MP, Seifert HS (2002) Roles of the *recJ* and *recN* genes in homologous recombination and DNA repair pathways of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 184: 919-927.
- Smeets LC, Kusters JG (2002) Natural transformation in *Helicobacter pylori*: DNA transport in an unexpected way. *Trends Microbiol* 10: 159-162.
- Smith MA, Edwards DI (1995) The influence of microaerophilia and anaerobiosis on metronidazole uptake in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 36: 453-461.
- Solnick JV (2003) Clinical significance of *Helicobacter* species other than *Helicobacter pylori*. *Clin Infect Dis* 36: 349-354.
- Solnick JV, Hansen LM, Salama NR, Boonjakuakul JK, Syvanen M (2004) Modification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein expression during experimental infection of rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2106-2111.

- Solnick JV, O'Rourke J, Lee A, Paster BJ, Dewhirst FE, Tompkins LS (1993) An uncultured gastric spiral organism is a newly identified *Helicobacter* in humans. *J Infect Dis* 168: 379-385.
- Solnick JV, Schauer DB (2001) Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbiol Rev* 14: 59-97.
- Spek EJ, Vuong LN, Matsuguchi T, Marinus MG, Engelward BP (2002) Nitric oxide-induced homologous recombination in *Escherichia coli* is promoted by DNA glycosylases. *J Bacteriol* 184: 3501-3507.
- Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ, Covacci A (2002) c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* 43: 971-980.
- Sterzenbach T, Lee SK, Brenneke B, von Goetz F, Schauer DB, Fox JG, Suerbaum S, Josenhans C (2007) Inhibitory effect of enterohepatic *Helicobacter hepaticus* on innate immune responses of mouse intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 75: 2717-2728.
- Stingl K, Altendorf K, Bakker EP (2002a) Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends Microbiol* 10: 70-74.
- Stingl K, Uhlemann EM, Schmid R, Altendorf K, Bakker EP (2002b) Energetics of *Helicobacter pylori* and its implications for the mechanism of urease-dependent acid tolerance at pH 1. *J Bacteriol* 184: 3053-3060.
- Stohl EA, Seifert HS (2006) *Neisseria gonorrhoeae* DNA recombination and repair enzymes protect against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 188: 7645-7651.
- Suerbaum S (2000) Genetic variability within *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 290: 175-181.
- Suerbaum S, Josenhans C (2007) *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol* 5: 441-452.
- Suerbaum S, Josenhans C, Labigne A (1993) Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* *flaB* flagellin genes and construction of *H. pylori* *flaA*- and *flaB*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol* 175: 3278-3288.
- Suerbaum S, Josenhans C, Sterzenbach T, Drescher B, Brandt P, Bell M, Droege M, Fartmann B, Fischer H-P, Ge Z, Hörster A, Holland R, Klein K, König J, Macko L, Mendz GL, Nyakatura G, Schauer DB, Shen Z, Weber J, Frosch M, Fox JG (2003) The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7901-7906.
- Suerbaum S, Maynard Smith J, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, Kunstmann E, Dyrek I, Achtman M (1998) Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12619-12624.
- Suerbaum S, Michetti P (2002) *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 347: 1175-1186.
- Surtees JA, Argueso JL, Alani E (2004) Mismatch repair proteins: key regulators of genetic recombination. *Cytogenet Genome Res* 107: 146-159.

- Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33: 25-35.
- Takata T, Aras R, Tavakoli D, Ando T, Olivares AZ, Blaser MJ (2002) Phenotypic and genotypic variation in methylases involved in type II restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* 30: 2444-2452.
- Taylor AF, Smith GR (1995) Monomeric RecBCD enzyme binds and unwinds DNA. *J Biol Chem* 270: 24451-24458.
- Taylor AF, Smith GR (2003) RecBCD enzyme is a DNA helicase with fast and slow motors of opposite polarity. *Nature* 423: 889-893.
- Taylor NS, Fox JG, Akopyants NS, Berg DE, Thompson N, Shames B, Yan L, Fontham E, Janney F, Hunter FM, Correa P (1995) Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 33: 918-923.
- Terradot L, Bayliss R, Oomen C, Leonard GA, Baron C, Waksman G (2005) Structures of two core subunits of the bacterial type IV secretion system, VirB8 from *Brucella suis* and ComB10 from *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4596-4601.
- Thompson SA, Blaser MJ (1995) Isolation of the *Helicobacter pylori* *recA* gene and involvement of the *recA* region in resistance to low pH. *Infect Immun* 63: 2185-2193.
- Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Venter JC, . (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388: 539-547. 15.
- Tsai-Wu JJ, Liu HF, Lu AL (1992) *Escherichia coli* *mutY* protein has both N-glycosylase and apurinic/apyrimidinic endonuclease activities on A:C and A:G mispairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8779-8783.
- Tsai-Wu JJ, Lu AL (1994) *Escherichia coli* *mutY*-dependent mismatch repair involves DNA polymerase I and a short repair tract. *Mol Gen Genet* 244: 444-450.
- Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ (2001) *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 345: 784-789.
- Umezumi K, Chi NW, Kolodner RD (1993) Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3875-3879.
- Umezumi K, Kolodner RD (1994) Protein interactions in genetic recombination in *Escherichia coli*. Interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem* 269: 30005-30013.
- Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F, Axon AT, Deltenre M, Hirschl AM, Gasbarrini G, O'Morain C, Garcia JM, Quina M, Tytgat GN (1999) Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. HpSA European study group. *Lancet* 354: 30-33.
- Vale FF, Vitor JM (2007) Genomic methylation: a tool for typing *Helicobacter pylori* isolates. *Appl Environ Microbiol* 73: 4243-4249.

- Vales LD, Rabin BA, Chase JW (1982) Subunit structure of *Escherichia coli* exonuclease VII. J Biol Chem 257: 8799-8805.
- Van Houten B (1990) Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. Microbiol Rev 54: 18-51.
- Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Memet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. Nat Immunol 5: 1166-1174.
- Viswanathan M, Lovett ST (1998) Single-strand DNA-specific exonucleases in *Escherichia coli*. Roles in repair and mutation avoidance. Genetics 149: 7-16.
- Vitkute J, Stankevicius K, Tamulaitiene G, Maneliene Z, Timinskas A, Berg DE, Janulaitis A (2001) Specificities of eleven different DNA methyltransferases of *Helicobacter pylori* strain 26695. J Bacteriol 183: 443-450.
- Walsh JH, Peterson WL (1995) The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. N Engl J Med 333: 984-991.
- Wang G, Alamuri P, Maier RJ (2006) The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol 61: 847-860.
- Wang G, Ge Z, Rasko DA, Taylor DE (2000) Lewis antigens in *Helicobacter pylori*: biosynthesis and phase variation. Mol Microbiol 36: 1187-1196.
- Wang G, Maier RJ (2008a) A RecB-like helicase in *Helicobacter pylori* is important for DNA repair and host colonization. Infect Immun .
- Wang G, Maier RJ (2008b) Critical role of RecN in recombinational DNA repair and survival of *Helicobacter pylori*. Infect Immun 76: 153-160.
- Ward JM, Fox JG, Anver MR, Haines DC, George CV, Collins MJJ, Gorelick PL, Nagashima K, Gonda MA, Gilden RV, et al (1994) Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species. J Natl Cancer Inst 86: 1222-1227.
- Warren JR, Marshall B (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1: 1273-1275.
- Webb BL, Cox MM, Inman RB (1997) Recombinational DNA repair: the RecF and *recR* proteins limit the extension of RecA filaments beyond single-strand DNA gaps. Cell 91: 347-356.
- Webb SA, Kahler CM (2008) Bench-to-bedside review: Bacterial virulence and subversion of host defences. Crit Care 12: 234.
- West SC (1996) The *ruvABC* proteins and Holliday junction processing in *Escherichia coli*. J Bacteriol 178: 1237-1241.
- Xu Q, Morgan RD, Roberts RJ, Blaser MJ (2000) Identification of type II restriction and modification systems in *Helicobacter pylori* reveals their substantial diversity among strains. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 9671-9676.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33: 103-119.

-
- Zagari RM, Bazzoli F, Pozzato P, Fossi S, De Luca L, Nicolini G, Berretti D, Roda E (1999) Review article: non-invasive methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Ital J Gastroenterol Hepatol 31: 408-415.
- Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. Plant J 23: 11-28.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Sebastian Suerbaum danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas, sein großes Interesse an meiner Arbeit und seine immerwährende Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Gerald-F. Gerlach danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dipl.-Biol. Claudia Moccia und Herrn Dr. Christian Kraft für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt unseren Kooperationspartnern Herrn Dr. Xavier Didelot und Herrn Dr. Daniel Falush für die umfangreichen statistischen Analysen sowie die gute Zusammenarbeit und die wertvollen Überlegungen, die zum Erfolg des Projekts beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Christine Josenhans möchte ich für die hilfreichen Diskussionen danken, die das Projekt voran gebracht haben.

Herrn Prof. Dr. Mark Achtman und Herrn Dr. Bodo Linz danke ich für die Erlaubnis zur Nutzung des Stammes Ala15 und Herrn Prof. Dr. Schalk van der Merwe für die Erlaubnis zur Nutzung des Stammes SA166A. Herrn Prof. Dr. Martin Blaser danke ich für das Plasmid pADC-HpMutY.

Meine Dissertation wurde im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs 745 „Mukosale Erreger-Wirt-Interaktionen“ durchgeführt. Herrn Prof. Dr. Peter Valentin-Weigand möchte ich für die gute Organisation dieses strukturierten Promotionsprogramms danken.

Bei Frau Birgit Brenneke, Frau Kerstin Ellrott und Frau Jessika Schulze bedanke ich mich für die Unterstützung im Labor.

Den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der beiden Helicobacter-Arbeitsgruppen der MHH danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung während meiner Arbeit. Ebenfalls möchte ich den Mitgliedern des GRK 745 für viele nette Abende und interessante Diskussionen bedanken.

Weiterhin Danke ich meinen Eltern, Martina und Karl-Heinz, für die Unterstützung und das Verständnis während der letzten Jahre.

Publikationen

Stefan Kulick, Claudia Moccia, Christian Kraft, Sebastian Suerbaum (2008) The *Helicobacter pylori* *mutY* homologue HP0142 is an antimutator gene that prevents specific C to A transversions. Arch Microbiol 189: 263-270.

Stefan Kulick, Claudia Moccia, Xavier Didelot, Daniel Falush, Christian Kraft, Sebastian Suerbaum (2008) Mosaic DNA imports with interspersions of recipient sequence after natural transformation of *Helicobacter pylori*. PLoS ONE 3: e3797.

Vorträge und Poster

Stefan Kulick, Rainer Söller, Stefan Schmidt. Development and evaluation of a real time PCR system for the rapid detection of *Legionella pneumophila*. 2. DGHM-VAAM Jahrestagung, Göttingen, September 2005 (Poster)

Stefan Kulick, Claudia Moccia, Christian Kraft, Sebastian Suerbaum. *mutY* (HP0142) is a mutator gene in *Helicobacter pylori*. 58. Jahrestagung der DGHM, Würzburg, Oktober 2006 (Poster)

Stefan Kulick, Claudia Moccia, Christian Kraft, Sebastian Suerbaum. An *in vitro* transformation model to study mechanisms of genetic variation in *Helicobacter pylori*. INCA - General Assembly meeting, Sesimbra, Portugal März 2007 (Poster)

Stefan Kulick, Claudia Moccia, Christian Kraft, Sebastian Suerbaum. *mutY* (HP0142) is a mutator gene in *Helicobacter pylori*. INCA - General Assembly meeting, Sesimbra, Portugal, März 2007 (Poster)

Stefan Kulick, Claudia Moccia, Christian Kraft, Sebastian Suerbaum. The *Helicobacter pylori* *mutY* homologue HP0142 is an antimutator gene that prevents specific C to A transversions. 6. *Helicobacter pylori*-Workshop, Herrsching, Oktober 2007 (Vortrag)

Stefan Kulick, Claudia Moccia, Christian Kraft, Xavier Didelot, Daniel Falush, Sebastian Suerbaum. Influence of DNA repair genes on the genetic variability of *Helicobacter pylori*. INCA Meeting, Sesimbra, Portugal, März 2008 (Poster)

Claudia Moccia, Stefan Kulick, Xavier Didelot, Kerstin Ellrott, Christian Kraft, Sebastian Suerbaum. The Role of *Helicobacter pylori* *ruvA*, *ruvB*, and *ruvC* genes in homologous recombination and mutation. 8. International Workshop on Pathogenesis and Host Response in *Helicobacter pylori*, Helsingör, Dänemark, Juli 2008 (Poster)

Stefan Kulick, Claudia Moccia, Xavier Didelot, Daniel Falush, Christian Kraft, Sebastian Suerbaum. Mosaic DNA imports with interspersions of recipient sequence after natural transformation of *Helicobacter pylori*. INCA Meeting, Sesimbra, Portugal, März 2009 (Vortrag)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefan Kulick
geboren am: 24.01.1978 in Buchholz i.d.N.
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1990 - 1998: Gymnasium in Tostedt
Schulabschluss: Abitur (Notendurchschnitt 2,2)

Wehrdienst

07/1998 – 04/1999: Fallschirmjägerbataillon in Oldenburg

Hochschulstudium

10/1999 – 03/2000: Studium der Verfahrenstechnik an der TUHH
04/2000 – 03/2002: Grundstudium der Biologie an der Universität Hamburg
Vordiplom (Notendurchschnitt: gut)
04/2002 – 12/2003: Hauptstudium der Biologie an der Universität Hamburg
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Genetik, Pharmazeutische Biologie
Zusatzfach: Biochemie
Diplomprüfung (Notendurchschnitt: sehr gut)
01/2004 – 10/2004: Diplomarbeit in Zusammenarbeit mit der Firma artus Gesellschaft für molekularbiologische Diagnostik und Entwicklung mbH
11/2004 – 10/2007: Doktorandenstipendium des DFG-Graduiertenkollegs 745, „Mukosale Erreger-Wirt-Interaktionen“; „Mechanismen der Entstehung genetischer Variabilität bei *Helicobacter pylori*“, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Suerbaum, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Medizinische Hochschule Hannover
11/2007-5/2009: Weiterführung des o.g. Promotionsprojektes als Wissenschaftlicher Mitarbeiter

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation „Mechanismen der Entstehung genetischer Variabilität bei *Helicobacter pylori*“ selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den

Stefan Kulick